

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DE LA TRIIODOTHYRONINE ET DE L'HEXANOATE SUR LA
RÉGULATION DE LA SYNTHASE DES ACIDES GRAS: IMPLICATION DES
VOIES NON-GÉNOMIQUES DE RÉGULATION.

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

GISELLE FERNANDEZ MOLINA

AOÛT 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier, d'abord et avant tout, ma directrice de recherche Catherine Mounier. Elle a toujours été en fonction de transmettre ses connaissances. Son esprit analytique et son guide ont été essentiels à la réalisation de ces travaux. Mais, au delà du plan professionnel, elle m'a appris à toujours regarder la vie d'un œil positif, peu importe le défi qui se place devant nous.

Un grand merci à mes collègues du laboratoire : Amine, Maxime, Sabri, Simon, Lamia, et aux stagiaires : Océane, Guillaume, Amir, Carèle, Freddy, Vincent, Ariane, Meriem, Vanessa, Eva. Quel climat de fraternité, d'entraide!! Quelle humanité! Ce temps vécu avec vous restera de façon indélébile dans ma mémoire.

Merci aux professeurs et aux étudiants du troisième étage et du BioMed, mention spéciale pour Oraly et Erlinda.

Merci à mes amis de Cuba et d'ici qui ont toujours cru en moi.

Merci à mon époux et mes deux enfants, pour qui je livre la bataille au jour le jour.

DÉDICACE

*À mes parents et ma sœur,
à vos encouragements et vos énergies
qui m'ont soutenu
pour tenir la route jusqu'au bout.*

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	viii
RÉSUMÉ.....	xii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	3
1.1 Le métabolisme des acides gras.....	3
1.2 La lipogenèse.....	3
1.3 Les enzymes de la voie lipogénique.....	4
1.4 Complexe protéique FAS.....	6
1.5 Régulation de la FAS.....	8
1.5.1 Régulation de la FAS.....	10
1.5.1.1 Récepteur à l'hormone thyroïdienne (TR).....	11
1.5.1.2 Modulation des mécanismes d'action de la T3.....	12
1.5.1.3 Action non-génomique de la T3.....	14
1.6 Régulation de la FAS par l'insuline.....	18
1.7 Régulation nutritionnelle de la FAS.....	21
1.8 Acides gras à chaînes moyennes (MCFAs).....	22
1.9 Récepteur β -intégrine.....	24
1.10 Src kinases.....	25
HYPOTHÈSES DE TRAVAIL.....	28

CHAPITRE II	
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	30
2.1 Matériels.....	30
2.2 Culture de la lignée cellulaire HepG2.....	30
2.3 Perfusion de foie de souris C57BL/6 et culture des cellules primaires.....	31
2.4 Traitement des cellules avec les hormones, les inhibiteurs et le C6.....	32
2.5 Mesure de l'activité enzymatique de la FAS.....	33
2.6 Test d'immunobuvardage de type Western.....	34
2.7 Analyses statistiques.....	35
CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	36
3.1 Rôle du récepteur β -intégrine dans la régulation de la FAS par la T3.....	36
3.2 Rôle de la protéine Src kinase dans la voie de régulation de la FAS induite par la T3.....	38
3.3 Rôle du C6 dans la régulation de la FAS.....	41
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	43
CONCLUSIONS.....	59
ANNEXE.....	60
BIBLIOGRAPHIE.....	69

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Principales étapes de la lipogenèse hépatique.....	5
1.2 Le cycle catalytique et l'organisation des domaines de la FAS.....	7
1.3 Modèle général d'action des hormones thyroïdiennes dans le noyau.....	11
1.4 Modèle moléculaire de la répression basale en absence de T3 et de l'activation transcriptionnelle en présence de T3.....	14
1.5 Représentation schématique de la régulation transcriptionnelle de la FAS en réponse à la T3 et à l'insuline.....	17
1.6 Transduction de signaux suite à la fixation de l'insuline sur son récepteur.....	19
1.7 Le promoteur de la FAS dans la souris.....	21
1.8 Organisation des domaines de la protéine Src kinase de poulet.....	27
3.1 Effet du Tetrac sur l'expression de la FAS.....	61
3.2 Effet du Tetrac sur l'activité enzymatique de la FAS.....	62
3.3 Effet de PP1 et de PP2 sur la phosphorylation de Src kinase.....	63
3.4 Effet de PP1 et de PP2 sur l'expression de la FAS.....	64
3.5 Effet de PP1 et PP2 sur l'activité enzymatique de la FAS.....	65
3.6 Relation entre β -intégrine et Src kinase.....	66
3.7 Effet du C6 sur la phosphorylation de Src kinase dans cellules HepG2...	67
3.8 Effet du C6 sur la phosphorylation de Src kinase dans cellules primaires de foie de souris C57BL/6.....	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
2.1	Anticorps et dilutions utilisés pour la détection des protéines par le test d'immunobuvardage de type Western.....	60

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ACC	Acétyl-CoA carboxylase
AMP	Adénine mono-phosphate
ARNm	Acide ribonucléique messenger
C6	Acide hexanoïque, hexanoate
C16	Acide palmitique, palmitate
CaMKII	Protéine kinase II dépendante de Ca ²⁺ /calmoduline
ChREBP	<i>Carbohydrate response element binding protein</i>
DR4	<i>Direct repeat 4</i>
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra acétique
EGTA	Acide éthylène glycol tétra acétique
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
eNOS	Synthétase endothéliale de l'oxyde nitrique
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FAS	Synthase des acides gras
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
Foxo	<i>Forkhead box O</i>

GSK-3	Glycogène synthase kinase
HDAC1	Histone désacétylase 1
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IRE	Élément de réponse à l'insuline
IRS	Substrats du récepteur à l'insuline
LXR α	Récepteur X du foie α
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCFA _s	Acides gras à chaînes moyennes
MEK	MAP kinase kinase
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCoR	Récepteur nucléaire corépresseur
NF-Y	<i>Nuclear factor Y</i>
PBS	<i>Phosphate buffer salin</i>
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate
PIP3	Phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B

PKC	Protéine kinase C
PMSF	<i>Phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride</i>
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes
PTB	<i>Phosphotyrosin binding domain</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
RXR	Récepteur X des rétinoïdes
SCD1	Stéaroyl-CoA désaturase 1
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	SDS- polyacrylamide gel électrophorèses
SMRT	médiateur silencieux des récepteurs rétinoïdes et de l'hormone thyroïdienne
Sp1	<i>Stimulatory protein 1</i>
SRCs	Coactivateurs du récepteur de stéroïdes
SRE	<i>Sterol response element</i>
SREBP-1	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TBST	<i>Tris buffer saline-Tween</i>
TG	Triglycérides
TR	Récepteur à la T3
TRE	Élément de réponse à la T3

USF	<i>Upstream stimulatory factor</i>
VDR	Récepteur à la vitamine D
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>

RÉSUMÉ

L'obésité est fortement associée à une lipogenèse hépatique élevée. La compréhension des mécanismes clefs de sa régulation est essentielle pour lutter contre cette maladie. La synthase des acides gras (FAS), une des enzymes clefs de la lipogenèse, est stimulée par la triiodothyronine (T3) et l'insuline, et inhibée par l'hexanoate (C6). La T3 est capable de réguler la FAS par des voies génomiques, en modulant l'affinité du dimère TR/RXR avec l'ADN puis en régulant la transcription des gènes cibles, mais des évidences d'une action non-génomique de la T3 sur l'expression de la FAS ont été récemment montrées, impliquant les protéines ERK1/2 et PI3K. L'interaction β -intégrine-Src kinase-PI3K a aussi été répertoriée. Nous proposons l'hypothèse qu'un récepteur de type β -intégrine déclenche une cascade de signalisation en réponse à la T3 affectant la FAS, que la protéine Src kinase est impliquée dans la dite cascade, et que le C6 agirait au niveau de la Src kinase pour inhiber partiellement les effets non-génomiques de la T3 sur la FAS.

Pour tester ces hypothèses, des cellules d'hépatocarcinomes humains de la lignée HepG2 ont été cultivées en présence de Tetrac, un antagoniste des récepteurs β -intégrines, ou avec les inhibiteurs de la phosphorylation des Src kinases, PP1 et PP2. Les cellules ont été, par la suite, stimulées avec la T3. Les niveaux d'expression de la FAS ont été mesurés par Western Blot; son activité enzymatique a aussi été mesurée. L'effet du C6 sur la phosphorylation de Src a été analysé par Western Blot.

L'incubation avec le Tetrac a induit une inhibition de l'expression de la FAS et de son activité enzymatique, et a aussi affecté la phosphorylation de Src kinase. Le traitement avec PP1 et PP2 a inhibé l'expression de la FAS et semble affecter son activité enzymatique. Le C6 a discrètement inhibé (10 %) la phosphorylation de Src kinase en présence de T3, mais n'a pas montré d'effet dans le cas où l'insuline était aussi dans le milieu de culture. Les résultats concernant le C6 ont été confirmés dans des cellules primaires de foie de souris.

L'ensemble des résultats appuient l'hypothèse d'une action non-génomique de la T3 par l'entremise du récepteur β -intégrine. La Src kinase semble être impliquée dans la cascade de signalisation déclenchée par la T3. Le C6 n'a pas été capable de diminuer de façon considérable l'activation de Src kinase en présence de T3, suggérant sans doute autre mécanisme d'action. Ces travaux revêtent une grande importance dans le contexte des recherches visant le contrôle de l'obésité, vu que la T3 active certaines enzymes de la lipogenèse dont la FAS, et que le C6 a des effets bénéfiques décrits sur la lipogenèse et l'adipogenèse.

Mots clés: lipogenèse, T3, β -intégrine, Src kinase, FAS, acides gras à chaînes moyennes

INTRODUCTION

L'obésité atteint les proportions d'une épidémie mondiale, avec au moins 2,8 millions d'adultes qui en meurent chaque année. Selon des données de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le nombre de cas d'obésité a doublé depuis 1980. En 2008, le surpoids concernait 1,5 milliard de personnes de 20 ans et plus, parmi lesquelles plus de 200 millions d'hommes et près 300 millions de femmes étaient obèses. De plus, pour les tranches d'âges comprenant les enfants et adolescents il y a également une augmentation, avec 40 millions d'enfants affectés dans le monde, selon estimations de 2011 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/>). Au Canada en 2010, 52.3% de la population adulte était atteinte d'embonpoint ou d'obésité (<http://www40.statcan.ca/102/cst01/health81b-fra.htm>).

L'obésité est souvent reliée à une dérégulation globale du métabolisme du sujet entraînant une hypertriglycéridémie, de bas niveaux de HDL-cholestérol et des niveaux élevés de glucose à jeun, un cadre connu pour augmenter le risque de morbidité et de mortalité dans les maladies cardiovasculaires (Nagao, 2010). On estime que, 44% des diabètes, 23% des cardiopathies ischémiques et 7% à 41% de certains cancers sont attribuables au surpoids et à l'obésité (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/>). Avec ce portrait, le contrôle de l'obésité est devenu une priorité majeure de santé.

Dans l'univers des enzymes pouvant être impliquées dans le développement de l'obésité, la synthase des acides gras (FAS) joue un rôle central. Elle participe à la lipogenèse *de novo* en synthétisant les acides gras saturés de 16 et 18 carbones. La

FAS est activée par les hormones comme l'insuline et la triiodothyronine (T3) ainsi que par le glucose, et est inhibée par les acides gras polyinsaturés, les acides gras à chaînes moyennes, et le glucagon. Les lipides jouent, cependant, des fonctions importantes à l'intérieur de l'organisme: source d'énergie, composition de membranes cellulaires, médiateurs d'inflammation, fonction hormonale, entre autres. La synthèse des lipides *de novo* est donc indispensable au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Nous proposons, alors, d'envisager une stratégie de modulation de la FAS, de façon à réduire son activité, tout en garantissant la production des lipides essentiels pour l'organisme.

Les acides gras à chaînes moyennes semblent des candidats prometteurs à cet effet. Ils ont montré une capacité d'inhiber partiellement l'activité de la FAS (Roncero, 1992; Akpa, 2010), l'acétyl CoA carboxylase (ACC) (Yin, 2000) et l'enzyme malique (Roncero, 1992), des enzymes appartenant à la voie lipogénique.

L'objectif de ce projet de recherche est d'étudier le mécanisme d'activation de la FAS par la T3 explorant la voie non-génomique. Nous nous proposons également, de tester l'effet de l'hexanoate, un acide gras à chaîne moyenne, sur la voie de signalisation induite par la T3.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Le métabolisme des acides gras

Les deux grands processus métaboliques qui gouvernent le métabolisme des acides gras sont la lipogenèse et la β -oxydation, soit respectivement la synthèse et la dégradation des lipides. Ces deux processus sont contrebalancés et contrôlés par l'état nutritionnel et hormonal de la cellule. L'inhibition de la lipogenèse *de novo* entraîne une augmentation de l'oxydation des acides gras et la diminution de la formation de triglycérides et de VLDL. En contrepartie, lors d'une activation de la production d'acides gras et de l'estérification de ceux-ci, la β -oxydation est inhibée (Fukuda et Ontko, 1984).

1.2 La lipogenèse

La lipogenèse ou synthèse *de novo* des lipides, représente l'ensemble des processus cellulaires qui sont impliqués dans la formation des acides gras ainsi que dans leur transformation, pour former des nouvelles molécules de lipides. Cette voie métabolique génère tout un éventail de molécules lipidiques qui auront différentes fonctions dans les organismes et les cellules, tout dépendamment de leur structure.

La lipogenèse s'effectue chez l'humain principalement au niveau du foie, bien qu'elle puisse être aussi observée à de faibles taux dans le tissu adipeux, les reins, les poumons et les glandes mammaires. Chez les autres mammifères et surtout chez les

rongeurs, ce processus s'effectue autant dans le foie que dans le tissu adipeux (Gandemer, 1980). Cependant, chez les oiseaux il a été observé un patron de lipogenèse similaire à celui de l'humain, avec une synthèse des lipides beaucoup plus importante dans le foie (Leveille, 1968).

1.3 Les enzymes de la voie lipogénique

La première enzyme de la voie lipogénique est l'ACC, qui capte l'acétyl-CoA issue du cycle de Krebs pour former le malonyl-CoA en ajoutant un groupement carboxyle à sa structure (Stoops, 1975; Wakil, 1983; Wakil, 1989). Le malonyl-CoA ainsi que l'acétyl-CoA sont ensuite utilisés par la FAS. Ces deux molécules seront les précurseurs des acides gras saturés de 16 et 18 carbones (figure 1.1). La FAS utilise la puissance réductrice du NADPH pour effectuer la biosynthèse des acides gras C16 saturés. Les acides gras formés peuvent ensuite être désaturés par les désaturases, dont la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1) en est la principale. Les élongases quant à elles vont se charger d'allonger les chaînes hydrocarbonées pour créer une panoplie d'acides gras de différentes longueurs, tandis que les mono- et diacylglycérol-transférases vont former différentes combinaisons d'esters d'acides gras, formant ainsi les triacylglycérols, en utilisant comme précurseurs les acides gras libres issus de la lipogenèse ainsi que le glycérol (Poortmans, 2003). Toutes ces enzymes vont contribuer à la création d'une diversité de lipides nécessaires aux fonctions de l'organisme.

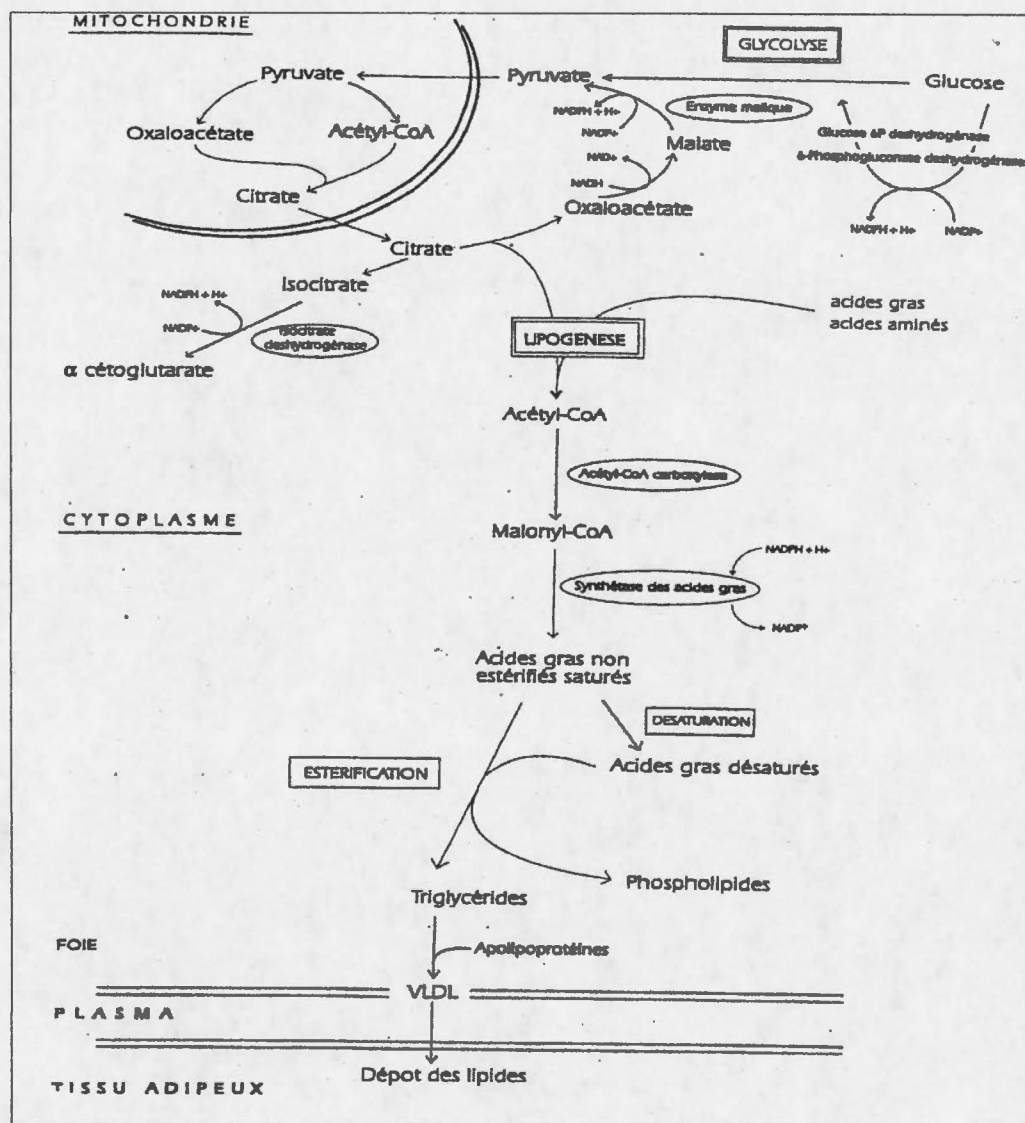


Figure 1.1. Principales étapes de la lipogénèse hépatique (Mounier, 1996)

1.4 Complexe protéique FAS

La FAS est un complexe protéique multifonctionnel regroupant sept activités catalytiques différentes (Maier, 2006) (figure 1.2). La FAS catalyse la synthèse des acides gras saturés de 16 et 18 carbones, selon une série de réactions dépendantes de NADPH, où interviennent les différentes activités catalytiques de l'enzyme à tour de rôle (figure 1.2). Chez les eucaryotes, elle est codée par un seul gène qui produit un seul ARNm chez la souris et deux ARNm chez le poulet et le rat, dû à un épissage alternatif (Back, 1986). La FAS est exprimée principalement dans le foie et le cerveau chez les humains et les oiseaux. Elle se localise dans le cytoplasme de la cellule (Gibson, 1958). Dans son état natif, la FAS est un homodimère dont chaque sous-unité a une taille approximative de 260 kDa (Wakil, 1989).

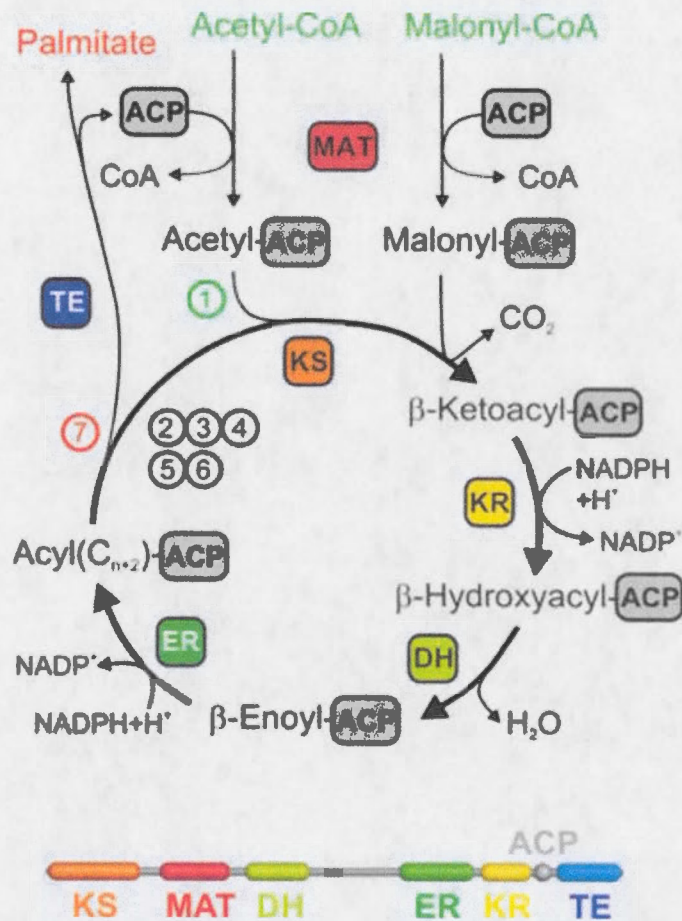


Figure 1.2. Le cycle catalytique et l'organisation des domaines de la FAS (Maier, 2006).

ACP, gris: protéine porteuse d'acyle; MAT, rouge: malonyl-CoA-/acetyl-CoA-ACP acyl transférase; KS, orange: β-cétoacyl synthase; KR, jaune: β-cétoacyl réductase dépendante de NADPH; DH, vert clair: déshydratase; ER, vert foncé: β-énoyl réductase dépendant de NADPH; TE, bleu: thioestérase. Le panneau inférieur montre l'organisation linéaire des domaines dans le gène de la FAS chez les mammifères (Maier, 2006).

1.5 Régulation de la FAS

Dans le foie, l'activité de la FAS est régulée par les hormones dont la T3 et l'insuline, ainsi que par les nutriments comme le glucose et le fructose. Son activité est inhibée par les acides gras polyinsaturés, le glucagon, l'AMP cyclique (Semenkovich, 2012), et selon une étude menée dans notre laboratoire, par les acides gras à chaînes moyennes (Akpa, 2010).

La FAS a été décrite comme une enzyme de maintenance cellulaire de base, en se chargeant de la production de lipides pour le stockage, et cela en état d'excès de nutriments, car elle est activée par les hydrates de carbone comme le glucose. Or, des études récentes commencent à dévoiler un rôle possible de la FAS comme enzyme intervenant dans la signalisation cellulaire du fait qu'elle affecterait l'oxydation d'acides gras en participant à la synthèse d'un ligand endogène, soit le 16:0/18:1-glycerophosphocholine, qui activerait le facteur de transcription PPAR α (de l'anglais *Peroxisome proliferator-activated receptor α*) (Chakravarthy, 2009). Le PPAR α intervient dans l'activation de la transcription d'enzymes impliquées dans la β -oxydation (Lodhi, 2011). Une autre étude a montré la participation de la FAS dans la génération d'un ligand qui activerait le PPAR γ , facteur de transcription impliqué dans la stimulation de la transcription d'enzymes affectées à la lipogenèse (Lodhi, 2012). La participation de la FAS a aussi été montrée dans la modulation de la fonction intestinale par palmitoylation de la mucine 2, une composante centrale du mucus intestinal. L'inactivation directe du gène de la FAS au niveau du côlon par le système

Cre-lox dans des souris, a été associée à des perturbations dans la barrière de mucus intestinal ainsi qu'à l'augmentation de la perméabilité intestinale, colite, inflammation systémique, et à des changements dans l'écologie microbienne intestinale. (Wei, 2012). La participation de la FAS a été également rapporté dans la modulation de la réponse homéostatique au stress du myocarde par inhibition de la protéine Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) qui régule les influx de calcium à la cellule (Razani, 2011), ainsi que sa participation au maintien de l'homéostasie vasculaire par une palmitoylation de la synthétase endothéliale de l'oxyde nitrique (eNOS), permettant ainsi sa localisation associée à la membrane plasmique (Wei, 2011).

D'un autre côté, il a été aussi observé que la modification post-traductionnelle de la FAS, soit par acétylation (Zhao, 2010), soit par phosphorylation sur des résidus sérine, thréonine ou tyrosine pourraient aussi moduler l'activité de l'enzyme, constituant ainsi un nouveau mécanisme de régulation de la FAS (Jensen-Urstad, 2012). L'inhibition de l'enzyme associée à une phosphorylation a été constatée dans des cellules de foie de pigeon (Qureshi, 1975), et après phosphorylation dans un résidu thréonine dans des cellules de la lignée adipocytaire murine 3T3-L1 (An, 2007). Des évidences de l'activation de la FAS après phosphorylation sur des résidus tyrosines ont été observées dans les cellules de carcinome mammaire humain SKBr3 (Jin, 2010; Hennigar, 1998). Nos travaux au laboratoire semblent aussi appuyer pour une régulation post-traductionnelle impliquant des mécanismes de phosphorylation (Radenne, 2008).

1.5.1 Régulation de la FAS par la T3

Les hormones thyroïdiennes sont essentielles pour la croissance, la différenciation cellulaire, le développement, et la maintenance de l'homéostasie métabolique (Yen, 2001). Elles influencent diverses voies métaboliques impliquant notamment le métabolisme des lipides et celui du glucose. Il existe deux formes principales d'hormone thyroïdienne, la thyroxine (T4) et la T3. La forme biologiquement active de l'hormone est la T3, tandis que la T4 est l'espèce la plus abondante dans le sang (Song, 2011). Dans les tissus cibles les déiodinases I et II vont catalyser la transformation de T4 à T3, contrôlant ainsi les niveaux intracellulaires de T3.

Le mécanisme d'action de la T3 a été caractérisé depuis longtemps comme étant un mécanisme exclusivement génomique, dans lequel l'hormone rentrerait dans la cellule pour se rendre jusqu'au noyau, où elle interagirait avec le complexe transcriptionnel des gènes cibles pour moduler leur transcription, en se fixant sur son récepteur nucléaire (Yen, 2001) (figure 1.3). Cependant, dans les dernières années des évidences d'une action non-génomique de l'hormone sont apparues (Radenne, 2008; Barreiro Arcos, 2011; Davis, 2011; Gnoni, 2011). Nonobstant, le mécanisme d'action transcriptionnel, soit le génomique, reste toujours présent, c'est-à-dire, les deux mécanismes d'action de l'hormone, génomique et non-génomique, semblent coexister à l'intérieur de la cellule.

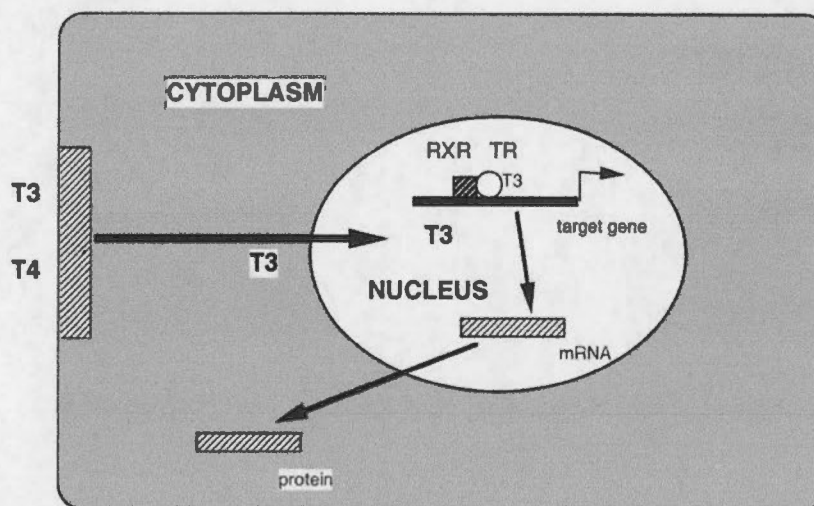


Figure 1.3. Modèle général d'action des hormones thyroïdiennes dans le noyau (Yen, 2001).

Modèle classique d'action de la T3, aussi appelé mécanisme génomique. RXR: récepteur X aux rétinoïdes, TR: récepteur à l'hormone thyroïdienne, T3: triiodothyronine et T4: L-thyroxine.

1.5.1.1 Récepteur à l'hormone thyroïdienne (TR)

La diversité d'effets de la T3 dans les différents tissus et cellules est médiée par le récepteur à la T3. Les TRs sont codés par deux gènes générant les récepteurs TR α et TR β , qui sont des protéines qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Les récepteurs nucléaires agissent comme facteurs de transcription en se liant aux différentes séquences cibles de l'ADN, spécifiquement dans le cas de la T3 aux éléments de réponse à la T3 ou TRE. Il existe trois isoformes de TR α , TR α 1, TR α 2, TR α 3, où les deux dernières ont perdu la capacité de se lier à la T3, mais comme leurs régions de liaison à l'ADN restent conservées ils agissent comme

antagonistes de l'action de la T3 (Macchia, 2001; Mitsuhashi, 1988). Également, il existe trois isoformes du TR β : TR β 1, TR β 2, TR β 3 (Song, 2011). Il y a une distribution différentielle des TRs dans les différents tissus, permettant de réguler l'action de l'hormone thyroïdienne dans l'organisme. Ainsi, le TR α 1 est abondamment exprimé dans le muscle squelettique, le cœur, et le tissu adipeux brun. Le TR β 1 est plus exprimé dans le foie, le cerveau et les reins, tandis que l'expression de TR β 2 est restreinte à l'hypothalamus et la glande pituitaire antérieure. Le TR β 3 est principalement exprimé dans les reins, le foie et les poumons (Song, 2011).

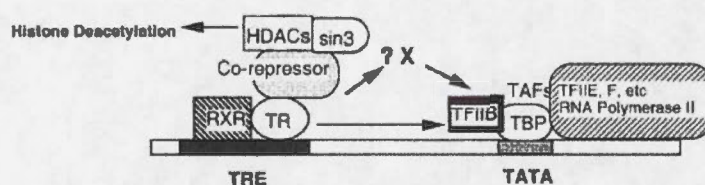
1.5.1.2 Modulation des mécanismes d'action de la T3

Les TRs exercent leur fonction sur le promoteur des gènes cibles en se couplant à un autre récepteur nucléaire. Dans le cas du TR, il s'associe au récepteur X des rétinoïdes (RXR). Cela induit une forte augmentation de l'affinité de liaison du TR à la plupart d'éléments de réponse à la T3 (TRE) (Lee, 1995; Song, 2011). D'autres partenaires ont aussi été décrits comme étant capables de former des hétérodimères avec le TR, soit les PPARs et le récepteur à la vitamine D (VDR) (Bogazzi, 1994; Schrader, 1994).

En plus des récepteurs nucléaires qui reconnaissent les séquences d'ADN consensus dans les TRE, la transcription des gènes cibles est aussi régulée par d'autres protéines capables d'agir comme activateurs ou répresseurs de la transcription dans le complexe transcriptionnel. Comme répresseurs de la transcription, les plus connus sont les protéines NCoR (récepteur nucléaire corépresseur) et SMRT (médiateur

silencieux des récepteurs rétinoïdes et de l'hormone thyroïdienne). Ces protéines se lient au TR en absence de T3, recrutent mSin3 et HDAC1, une désacétylase des histones, qui rend l'ADN plus compact et moins accessible, ce qui a pour effet de réprimer la transcription (Song, 2011). Dans le sens contraire, les coactivateurs augmentent l'activité transcriptionnelle du TR en présence de T3. Lors de l'arrivée de la T3 sur son site de fixation sur le TR, celui-ci subit un changement de conformation, qui va conduire à la dissociation des répresseurs du complexe transcriptionnel. Il existe des évidences expérimentales qui suggèrent la liaison des protéines sur le dimère TR/RXR ainsi que sur le complexe transcriptionnel à l'arrivée de la T3; ces protéines auraient un rôle activateur de la transcription; parmi elles on peut citer les coactivateurs du récepteur de stéroïdes (SRCs), Trip-1 (*TR interacting protein 1*), CBP/p300, et le complexe coactivateur TRAP (Cheng, 2000; Yen, 2001) (certaines des protéines et complexes activateurs ou répresseurs se montrent dans la figure 1.4).

- T3



+ T3

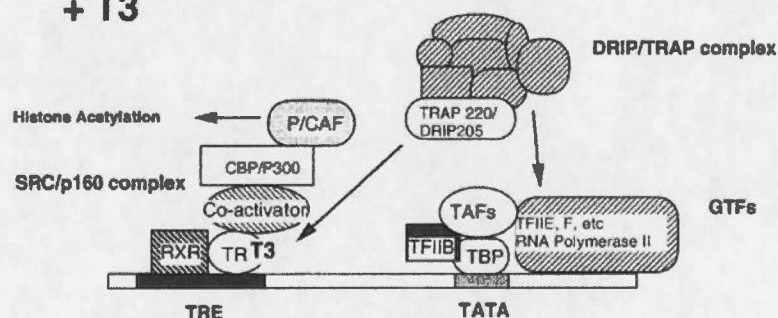


Figure 1.4. Modèle moléculaire de la répression basale en absence de T3 et de l'activation transcriptionnelle en présence de T3 (Yen, 2001).

En haut, la répression basale en absence de T3. HDAC: histone désacétylase et sin3 assurent la répression. X: facteur(s) répresseur(s) non identifié(s) dans le temps où cette figure a été confectionné; voir précisions dans le texte. X agirait aussi sur le complexe transcriptionnel. En bas, l'activation transcriptionnelle en présence de T3.

1.5.1.3 Action non-génomique de la T3

Les mécanismes d'action non-génomique de l'hormone thyroïdienne se caractérisent par une action rapide, en contraste avec l'action génomique qui prend quelques heures pour se manifester. L'action non-génomique de la T3 est principalement

mediée par les voies de transduction de signal. Les participations de la *phosphatidylinositol-3-kinase/Akt* (PI3K/Akt), l'*extracellular regulated kinase/mitogen-activated protein kinase* (ERK/MAPK), la protéine kinase C (PKC) et la protéine kinase A (PKA) entre autres, ont été montrées dans quelques études (Radenne, 2008; Davis, 2011; Gnoni, 2011; Barreiro Arcos, 2011). Cette action extranucléaire nécessiterait un récepteur au niveau de la membrane extracellulaire. Il a été récemment rapporté la capacité de la T3 d'activer de façon rapide la voie PKB/Akt dans des cellules de muscle squelettique de rats (de Lange, 2008). La même voie serait stimulée dans des fibroblastes humains pour aboutir à la transcription du gène ZAKI-4 (Cao X, 2005). Cette voie de signalisation impliquerait l'interaction entre TR β 1 et PI3K (Cao X, 2005). Une action non-génomique de la T3 dans l'induction de l'expression du SREBP-1 (de l'anglais sterol regulatory element-binding protein) dans les cellules HepG2 a aussi été caractérisée (Gnoni, 2011), ainsi qu'un rôle de cette même voie dans la prolifération de lymphocytes T, impliquant dans les deux cas PI3K/Akt, ERK1/2 et PKC (Barreiro Arcos, 2011).

Des travaux précédemment effectués dans notre laboratoire, ont montré qu'il existe des mécanismes de phosphorylation impliquant des sérine/thréonine kinases qui seraient impliqués dans la régulation de la FAS, du fait que les traitements avec le H7 (inhibiteur des sérine/thréonine kinases) ont diminué l'activité enzymatique de la FAS (Radenne, 2008). Les traitements avec des inhibiteurs spécifiques de PI3K et MEK MAPK ont affecté l'activité enzymatique de la FAS, ainsi que l'activité

transcriptionnelle de deux constructions comportant, l'une, l'élément de réponse à la T3 (TRE), et l'autre, un élément de réponse consensus de type DR4, soit une répétition directe des nucléotides. Au niveau des voies de signalisation, le traitement avec PD-98059 et U-0126, des inhibiteurs de MEK MAPK ont diminué la phosphorylation d'ERK1/2 en présence de T3, par rapport à la condition où les cellules ont été stimulées juste avec l'hormone, indiquant l'activation d'ERK1/2 par la T3 (Radenne, 2008) (figure 1.5).

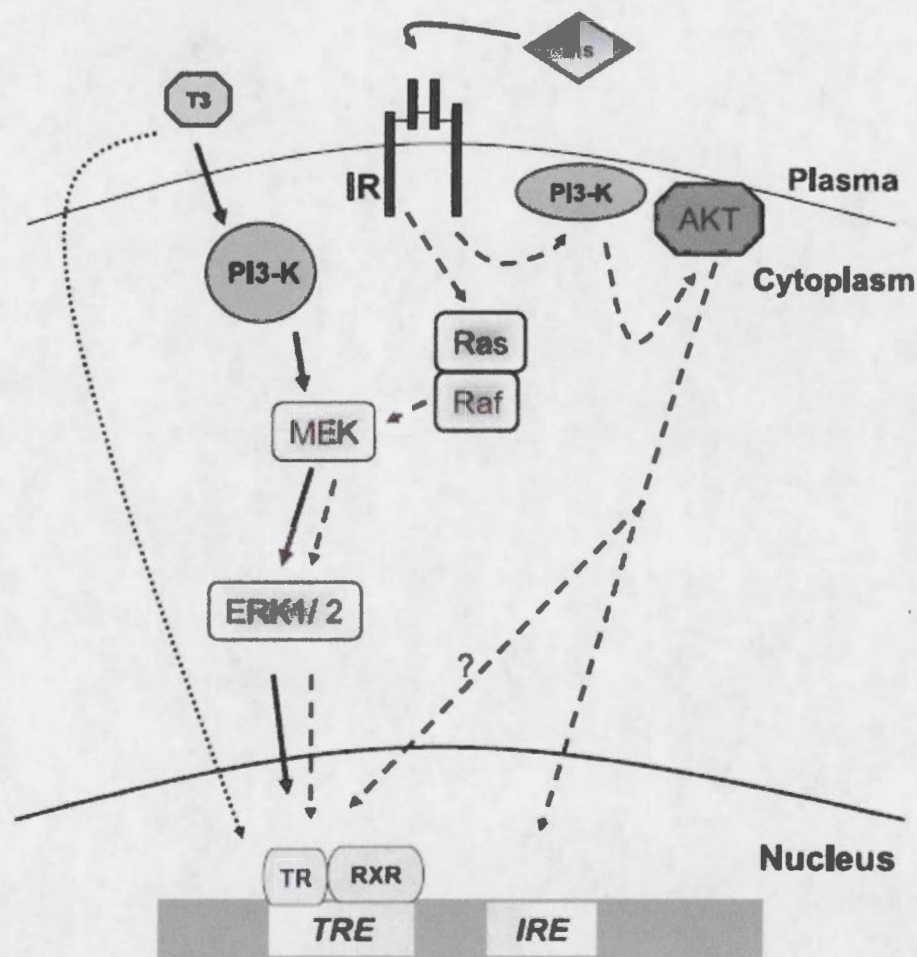


Figure 1.5. Représentation schématique de la régulation transcriptionnelle de la FAS en réponse à la T3 et à l'insuline (Radenne, 2008).

La T3 régule la transcription du gène de la FAS via un mécanisme génomique par fixation sur l'hétérodimère TR/RXR sur le TRE. La T3 modulerait également l'activité transcriptionnelle du TRE via un mécanisme non-génomique par l'activation d'une voie dépendante de PI3K/ERK1/2 MAPK.

1.6 Régulation de la FAS par l'insuline

L'insuline est une hormone protéique sécrétée par les cellules β du pancréas après la prise alimentaire. Les fonctions de cette hormone sont reliées principalement à l'homéostasie du glucose, le transport du glucose, la synthèse du glycogène, le métabolisme du cholestérol, la synthèse des lipides, la mitogenèse et la transcription des gènes (Mounier et Posner, 2006). L'insuline contrôle la transcription via la modification de la liaison des facteurs de transcription aux éléments de réponse à l'insuline (IRE) ou en régulant leur activités transcriptionnelles. Suite à la liaison de l'insuline à son récepteur, celui-ci s'autophosphoryle. Il se produit alors une activation de l'activité tyrosine kinase du récepteur, qui va recruter et phosphoryler la famille de substrats du récepteur à l'insuline (IRS-1, 2, 3 ou 4), entre autres protéines, qui interagissent par la suite avec des protéines de signalisation comportant de domaines SH2. Ceci résulte en une diversité de voies de signalisation activées, notamment la voie de PI3K/Akt, et la voie de MAPK (Saltiel et Kahn, 2001). La phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) est une enzyme constituée de deux sous-unités, la p85, appelée sous-unité régulatrice, et la p110, la sous-unité catalytique. Les IRSs phosphorylés vont recruter et activer la sous-unité régulatrice. Celle-ci va à son tour se coupler à la sous-unité p110 pour migrer vers la membrane plasmique où elle phosphorylera les phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂) pour former des phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃) (Bevan, 2001; Lizcano et Alessi, 2002; Saltiel et Kahn, 2001) (figure 1.6). En aval de PI3K plusieurs cascades de

signalisation ont été décrites, impliquant entre autres Akt, la voie des ERK1/2 MAPK et la voie de la glycogène synthase kinase (GSK-3).

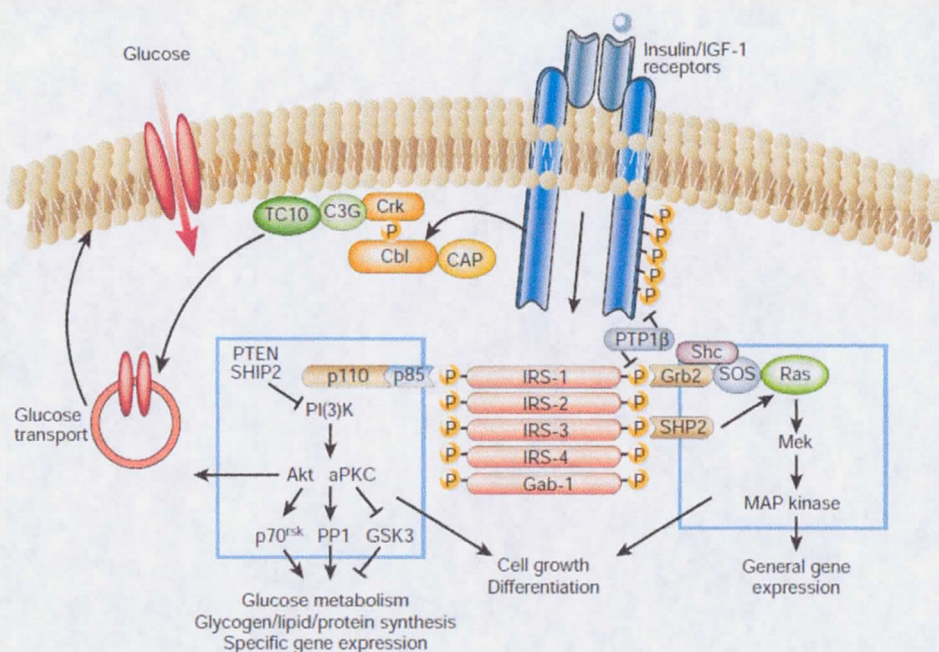


Figure 1.6. Voies de signalisation activées par l'insuline (Saltiel et Kahn, 2001)

La fixation de l'insuline sur son récepteur résulte en une diversité de voies de signalisation activées. Ces cascades agissent de façon concertée, pour réguler le transport des vésicules, la synthèse protéique, l'activation ou l'inactivation d'enzymes, l'expression génique, ce qui aboutit ultimement à la régulation du métabolisme du glucose, des lipides et des protéines.

Toutes ces voies vont aboutir à la modulation des facteurs de transcription. L'action inhibitrice de l'insuline est souvent médiée par le facteur de transcription Foxo (de l'anglais *Forkhead box O*). Ce facteur de transcription est phosphorylé par Akt induisant sa polyubiquitination et sa dégradation. Les facteurs de transcription de la

famille des SREBP (*Sterol regulatory element-binding protein*) sont souvent impliqués dans l'activation de la transcription des gènes cibles de l'insuline, tandis que Sp1 peut induire soit une fonction activatrice, soit une fonction inhibitrice (Mounier et Posner, 2006). En général, les études indiquent que les effets de l'insuline sur la transcription génique impliquent différentes voies de signalisation qui varient en fonction de chaque gène, et que l'insuline exerce son action de façon tissu spécifique (Mounier et Posner, 2006).

Sur le gène de la FAS, il existe un premier IRE localisé à environ -65 pb constituant une boîte E, appelée ainsi car il contient deux ou plus séquences régulatrices (Mounier et Posner, 2006; Jensen-Urstad et Semenkovich, 2012) (figure 1.7). Il a été déterminé que cette boîte contient les sites de liaison pour les facteurs de transcription USF-1 et USF-2 (Mounier et Posner, 2006). D'autres séquences dans le promoteur sont cependant requises pour qu'il y ait une activation complète en réponse à l'insuline. C'est le cas des deux sites de liaison au SREBP-1c localisés à environ -150 pb et l'autre à -65 pb, qui coïncide avec la boîte E. Le site de réponse aux stéroïdes (SRE) situé à -150 pb semble être le plus important au niveau physiologique pour l'activation par l'insuline de la transcription de la FAS. Cependant, il existe d'autres sites tels que le site de liaison au facteur de transcription nucléaire NF-Y, et le site de fixation de Sp1. La mutation d'un seul de ces sites abolirait totalement l'effet de l'insuline et du glucose sur la transcription du gène de la FAS (Mounier et Posner, 2006). Il a été récemment montré que le promoteur de la FAS comporterait un site de régulation spécifique au facteur de transcription LXR α ou récepteur X du foie

(Joseph, 2002; Yu, 2012) (figure 1.7). LXR α régulerait de façon indirecte la transcription de la FAS par activation de la transcription de SREBP-1c. Il a été décrit la présence de deux sites de régulation spécifiques à LXR α sur le promoteur de SREBP-1c, et que l'élimination de ces sites réduirait drastiquement la transcription du gène (Chen, 2004).

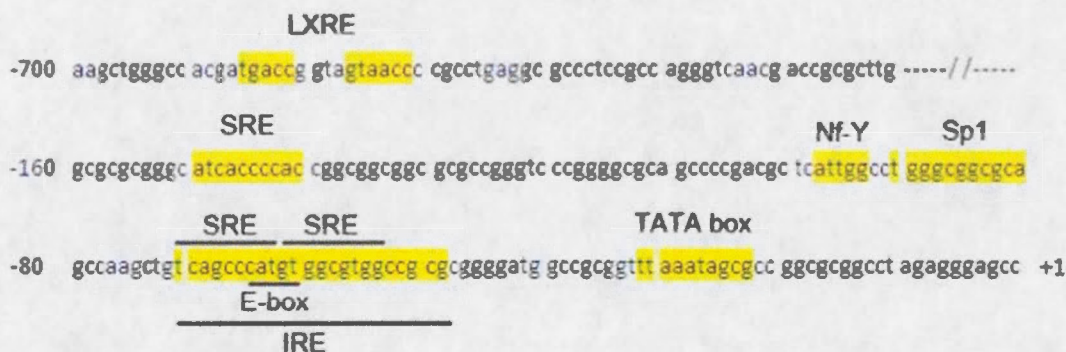


Figure 1.7. Le promoteur de la FAS dans la souris (Jensen-Urstad et Semenkovich, 2011).

Les différents éléments régulateurs qui ont été caractérisés sur le gène murin de la FAS sont surlignés en jaune. LXR: élément de réponse au récepteur X hépatique; SRE: élément de réponse aux stérols; IRE: élément de réponse à l'insuline; Sp1: protéine stimulatrice 1; Nf-Y: facteur nucléaire Y.

1.7 Régulation nutritionnelle de la FAS

Un régime riche en sucre induit une augmentation de l'expression de la FAS (Back, 1986; Semenkovich, 1997). Le mécanisme se produit au niveau transcriptionnel, où le glucose induit la fixation du facteur de transcription ChREBP (Carbohydrate response

element binding protein) sur son élément de réponse localisé sur le promoteur de la FAS (Uyeda, 2002; Ma, 2006). Le glucose régule aussi la FAS de façon indirecte, en augmentant les niveaux d'insuline circulante. L'insuline est connue pour augmenter le taux de transcription de l'enzyme, par l'intermédiaire de différents facteurs de transcription, comme décrit dans le point précédent.

Les acides gras polyinsaturés (PUFAs) sont aussi capables de réguler la FAS en réduisant ses taux de transcription (Blake et Clarke, 1990). Ils diminueraient le facteur de transcription SREBP (Moon, 2002), ou inhiberaient la fixation de la T3 sur le TR au niveau du noyau pour diminuer la transcription génique (Inoue, 1989).

1.8 Acides gras à chaînes moyennes (MCFAs)

Les MCFAs sont des acides gras saturés de 6 à 10 atomes de carbone, bien que quelques auteurs incluent aussi ceux de 12 carbones. Ils se retrouvent dans l'huile de coco, l'huile de palme et le lait. Du point de vue physico-chimique, les MCFAs ont des propriétés différentes des acides gras à longues chaînes, et cela détermine leurs propriétés biologiques (absorption et métabolisme). Comparés au triglycérides contenant des acides gras saturés à long chaîne les triglycérides d'acides gras à chaînes moyennes ont une température de fusion plus basse, une taille moléculaire plus petite, sont liquides à température ambiante et ont une plus basse densité énergétique (8.4 vs 9.2 kcal/g) (Marten, 2006). Dès les années 50s, les MCFAs ont été utilisés pour le traitement diététique du syndrome de malabsorption, grâce à ses propriétés d'absorption rapide. Les triglycérides de MCFAs sont rapidement

hydrolysés en acides gras à chaînes moyennes libres, puis absorbés directement par le foie via la veine porte. Ils n'ont pas besoin de protéines de transport ni de transporteurs à proprement parlé pour rentrer dans la cellule. Une fois rendu à l'intérieur des cellules hépatiques, ils sont incorporés dans les mitochondries sans médiation de la carnitine et utilisés comme source d'énergie (β -oxydation) (Papamandajaris, 1998), de façon différente aux acides gras à longues chaînes, qui eux, ont besoin de la carnitine pour accéder à la mitochondrie. En outre, il a été montré en 1987 que les MCFAs avaient une capacité lipogénique et adipogénique diminuée par rapport aux acides gras à longues chaînes chez les rats (Hashim, 1987). Les triglycérides composés d'acides gras à chaînes moyennes sont capables de réduire l'adiposité par une régulation négative des gènes adipogéniques et du PPAR γ chez le rat (Han, 2003). La consommation d'une diète de MCFAs diminue la sécrétion de lipoprotéines et de triglycérides sériques à l'état postprandial (Asakura, 2000). Il a été aussi observé que les MCFAs sont capables de diminuer les symptômes associés au syndrome métabolique (Nagao, 2010). D'un autre côté, les préadipocytes de type 3T3-L1 exposés aux MCFAs accumulent moins de lipides et ne se différencient pas de façon aussi efficace comparé au traitement avec l'acide oléique (Guo, 2000). Les MCFAs diminuent la déposition des lipides dans les tissus, augmentent la thermogénèse chez les rats (Crozier, 1987), augmentent la dépense énergétique chez l'humain durant la période postprandiale (Scalfi, 1991; St-Onge,

2003), ainsi que réduisent le poids corporel associé à une diminution de la résistance à l'insuline chez les sujets diabétiques sans médication (Han, 2007).

Concernant le mécanisme d'action moléculaire des MCFAs, une étude menée dans notre laboratoire qui prenait en considération les effets de l'hexanoate sur la FAS, a révélé qu'il était capable de diminuer son activité enzymatique de 50 à 60% en présence d'insuline et de T3, et que cette inhibition n'était pas allostérique (Akpa, 2010), mais partiellement transcriptionnelle. De plus, les résultats indiquaient la participation d'un dérivé acyl-CoA dans le mécanisme d'inhibition partielle de l'activité de l'enzyme (Akpa, 2010).

1.9 Récepteur β -intégrine

Les intégrines constituent des récepteurs de surface cellulaire qui connectent l'intérieur de la cellule à l'environnement extracellulaire. Elles peuvent former des connexions structurelles pour faciliter les processus d'adhésion et de migration, participant à la signalisation cellulaire à travers la membrane (Wegener, 2008). Les intégrines participent à une grande variété des voies de signalisation cellulaire, et ont des rôles dans des processus comme l'apoptose, l'expression des gènes et la différenciation cellulaire (Wegener, 2008). Ces récepteurs forment des hétérodimères composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Les domaines intracellulaires des sous-unités interagissent avec certaines protéines cellulaires. Les interactions de la sous-unité α sont beaucoup plus limitées. La sous-unité β , de son côté, est capable

d'interagir avec un certain nombre de protéines qui contiennent un domaine PTB de liaison à des phosphotyrosines capable de reconnaître une séquence de type NPxY présente sur la structure de la queue intracellulaire de la β -intégrine (Wegener, 2008; Phillips, 2001). Quelques études ont rapporté l'interaction des β -intégrines avec des protéines intracellulaires. Dans le cas de l'angiogenèse pathologique, la β 3-intégrine forme un complexe avec le VEGFR-2 (le récepteur au facteur de croissance endothéliale) après stimulation par le facteur de croissance endothéliale (VEGF), processus où la phosphorylation de l'intégrine sur un résidu de tyrosine s'est révélée essentielle (Mahabeleshwar, 2006). Le traitement des hépatocytes avec l'insuline et avec un peptide antagoniste des β -intégrines, a diminué la phosphorylation de Src kinase, de FAK et de p38 MAPK, suggérant une interaction entre les récepteurs β -intégrines et ces protéines de signalisation (Schliess, 2004). Dans des ostéoclastes, il a été rapporté que la phosphorylation de la Src kinase se produit de façon dépendante à la β 3-intégrine, et que la phosphorylation de c-Cbl, une protéine de signalisation connue par être activée par les β -intégrines (Melandar, 2003; Sanjay, 2001) et d'autres récepteurs comme le récepteur à l'insuline (Saltiel et Kahn, 2001), est drastiquement réduite en absence de l'intégrine (Faccio, 2003).

1.10 Src kinases

Il y a neuf protéines de la famille des Src (du mot *sarcome*) kinases dans le génome humain. Ces protéines sont toutes étroitement liées les unes aux autres et partagent le

même mécanisme de régulation (Martin, 2001). Un membre de cette famille, la protéine Src intervient dans un éventail de cascades de transduction de signaux qui affectent la prolifération, la différenciation, la motilité et la survie des cellules (Dehm et Bonham, 2004). La structure moléculaire des protéines de la famille des Src kinases contient six domaines, dont le domaine d'homologie SH4, aussi appelé domaine de myristoylation (M), la région unique (U) spécifique à chaque membre de la famille, les domaines SH3 et SH2, le domaine catalytique et une courte séquence finale de régulation négative (Thomas et Brugge, 1997; Dehm et Bonham, 2004) (figure 1.8). Le domaine SH2 contient un domaine de liaison aux résidus de phosphotyrosine (PTB) (Thomas et Brugge, 1997). La phosphorylation du résidu Y416 localisé dans le domaine catalytique, rend active la protéine (Thomas et Brugge, 1997; Dehm et Bonham, 2004) (figure 1.8). L'interaction entre la Src kinase et la β -intégrine a été mise en évidence (Faccio, 2003; Schliess, 2004; Thomas et Brugge, 1997). La Src kinase a été impliquée dans l'activation de Ras-MAPK dépendante des intégrines, modulant le processus de migration cellulaire (Schlaepfer, 1997; Klemke, 1997). La Src kinase est aussi capable d'interagir avec la PI3K dans différentes conditions. Dans des cellules neuronales, le complexe TR α 1-p85 α -Src a été détecté suite à la stimulation avec la T3, ce qui a été atténué par l'utilisation d'un inhibiteur de la Src kinase (Cao X, 2009). Dans des cellules alvéolaires épithéliales de rat, la T3 a stimulé l'activité Na-K-ATPase via l'activation de Src et de PI3K (Lei, 2004). Par ailleurs, la Src kinase et la PI3K semblent interagir suite à l'activation de

la Src par des récepteurs de réponse immune comme le récepteur à l'interleukine-2 dans cellules de souris (Augustine, 1991), et par les immunoglobulines M (IgM), que constituent les récepteurs antigéniques des lymphocytes B (Yamanashi, 1992). Les protéines de la famille des Src kinases peuvent s'associer physiquement au TCR (*T cell receptor*), ainsi qu'aux récepteurs CD4 de lymphocytes T auxiliaires et aux récepteurs CD8 de lymphocytes T cytotoxiques (Samelson, 1992, Tsygankov, 1996).

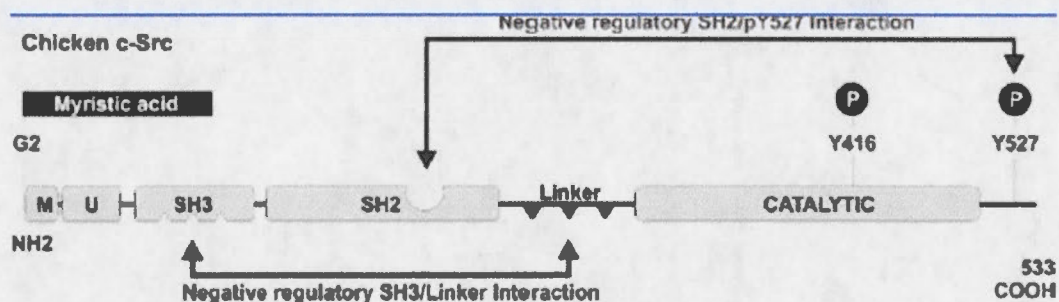


Figure 1.8 Organisation des domaines de la protéine Src kinase de poulet (Dehm et Bonham, 2004).

M: domaine de myristoylation aussi appelé domaine SH4; U: région unique; SH2, SH3: domaines d'homologie Src; Catalytic: domaine catalytique.

HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

Hypothèse 1: La T3 activerait la cascade de signalisation via le récepteur β -intégrine dans cellules d'origine hépatique.

Des évidences d'un mécanisme d'action non-génomique de la T3 ont été montrées dans les dernières années (Lei, 2004; Radenne, 2008; Cao X, 2009; Gnoni, 2011; Barreiro Arcos, 2011). La T3 semble capable d'activer des protéines de signalisation intracellulaire comme la Src kinase, c-Cbl, PI3K, ERK1/2, entre autres. Il a été précédemment documenté dans la littérature une interaction entre le récepteur β -intégrine et la protéine Src kinase (Thomas et Brugge, 1997). Nous avons alors étudié le rôle potentiel de ce récepteur dans le déclenchement d'une cascade de signalisation en réponse à la T3.

Hypothèse 2: Le récepteur β -intégrine activerait la protéine Src kinase dans cellules d'origine hépatique.

Les travaux de A. Radenne dans notre laboratoire ont mis en évidence l'activation de la PI3K suite à une stimulation par la T3. Selon certains études, la PI3K est capable d'interagir avec la protéine Src kinase (Lei, 2004; Cao, 2009). Ceci a été montré de façon indirecte dans l'étude de Liu, 2004, où l'inhibition de Src a diminué la phosphorylation d'Akt, qui est un substrat connu de la PI3K (Saltiel et Kahn, 2001).

Nous proposons l'hypothèse que dans cellules d'origine hépatique, la stimulation par la T3 activerait la protéine Src kinase par l'entremise du récepteur β -intégrine. La Src kinase activerait par la suite la PI3K.

Hypothèse 3: Le C6 inhiberait partiellement l'activité de la Src kinase activée par la T3 et/ou l'insuline, dans cellules d'origine hépatique, expliquant l'inhibition de la FAS au niveau transcriptionnel.

Le C6 a été capable d'inhiber partiellement l'activité de la FAS en présence de la T3 et de l'insuline (Akpa, 2010). Toujours selon les résultats de M. Akpa, le C6 ne semblait pas exercer une action allostérique, mais plutôt qu'il devait se trouver à l'intérieur de la cellule pour produire les effets d'inhibition de la FAS. Sachant que la Src kinase peut être stimulée par l'insuline aussi bien que par la T3 (Thomas et Brugge, 1997), nous nous proposons d'explorer un possible point de régulation du C6 sur la FAS au niveau de la protéine Src kinase, et ce dans cellules d'origine hépatique.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériels

Les cellules HepG2 ont été achetées chez ATCC (Manassas, VA). Le milieu EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) a été acheté chez Wisent (Saint-Bruno, QC). Le sérum de veau fœtal a été acheté chez Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). La 3,5,3'-L-triiodothyronine, l'insuline, le PP1 et le PP2, ainsi que l'anticorps anti- β -actine ont été obtenus auprès de la compagnie Sigma (Saint-Louis, MO). Le Tetrac (3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic acid) ainsi que l'anticorps FAS ont été acheté chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Les anticorps anti-Src total, anti-phospho-Src (Tyr416) et anti- α -tubuline ont été obtenus chez Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA). Les antibiotiques Pénicilline-Streptomycine, l'antifongique Fongizone, et la trypsine ont été achetés chez Invitrogen (Grand Island, NY). À moins d'indication contraire, tous les autres matériels utilisés pour les analyses ont été achetés chez Sigma.

2.2 Culture de la lignée cellulaire HepG2

La lignée cellulaire HepG2 est une lignée cellulaire adhérente dérivant d'un hépatocarcinome humain (Semenkovich, 1997). Ce sont des cellules de choix pour les expériences du métabolisme hépatique. Elles ont été plus particulièrement utilisées pour l'étude de la lipogenèse, car elles conservent toutes les caractéristiques

lipogéniques inhérentes au foie, ainsi que la sensibilité aux hormones. Les cellules ont été entretenues à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5% de CO₂, dans un milieu de culture EMEM supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal et 1% (v/v) d'antibiotiques (Pénicilline 10 000 unités/ml-Streptomycine 10000 µg/ml). Lors de chaque passage les cellules sont détachées de leur support plastique à l'aide d'une solution de trypsine (0,25% (p/v), EDTA 1 mM).

2.3 Perfusion de foie de souris C57BL/6 et culture d'hépatocytes primaires

Des souris mâles C57BL/6 de type sauvage (protocole CIPA # 739) ont été anesthésiées par voie intrapéritonéale avec du Sodium Pentobarbital 54,7 mg/ml, à raison de 70 mg/kg (Ceva Santé Animale, Libourne, France). Les foies ont été dans un premier temps perfusés *in vivo* à l'aide du tampon HEPES (142 mM NaCl; 6.7 mM KCl; 10 mM HEPES; pH 7.85) avec 0.6 mM EGTA; 1.5 U/ml héparine, pour éliminer le sang, puis rincés au tampon HEPES. Par la suite, une perfusion avec le tampon HEPES contenant 200 U/ml collagénase; 12 mM CaCl₂·2H₂O a été effectuée. Les foies ont été disséqués et transférés dans des plaques de Petri puis lavées avec le milieu DME/F12, 29 mM NaHCO₃, 21 mM HEPES, pH 7.2; 5% (v/v) (Pénicilline 10 000 unités/ml-Streptomycine 10 000 µg/ml, Fongizone 250 µg/ml) et 10% (v/v) sérum de veau fœtal, pour dissocier les hépatocytes. Au moins trois cycles de centrifugation pendant 5 min à 500 rpm à 4 °C suivis de résuspension dans le milieu de lavage ont été effectués. Les cellules ont étéensemencées à confluence dans des

plaques 12 puits dans du milieu DME/F12, 29 mM NaHCO₃, 21 mM HEPES, pH 7.2; 1% (v/v) (Pénicilline 10 000 unités/ml-Streptomycine 10 000 µg/ml, Fongizone 250 µg/ml), 10% (v/v) sérum de veau fœtal.

Les plaques ont été préalablement traitées au collagène 10% dans du PBS sous atmosphère humide, pendant 1 h à 37 °C.

Les hépatocytes ont été cultivés à 37°C sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂. Un ou deux jours après, le milieu de culture a été changé par du DMEM 1% (v/v) (Pénicilline 10 000 unités/ml-Streptomycine 10 000 µg/ml, Fongizone 250 µg/ml), sans sérum de veau fœtal, afin de procéder à l'expérience avec les cellules.

2.4 Traitement des cellules avec les hormones, les inhibiteurs et le C6

Une fois les cellules arrivées à 80% de confluence, elles ont été lavées deux fois au PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.3). Le milieu de culture a été changé par EMEM 1% (v/v) d'antibiotiques. Les cellules ont été incubées dans cette condition pendant 24 à 48 h. Pour la stimulation, ce milieu a été éliminé, les cellules ont encore été lavées deux fois au PBS 1X et du nouveau milieu EMEM 1% (v/v) d'antibiotiques a été remis contenant cette fois-ci les hormones, les inhibiteurs ou les substances à tester en fonction de l'expérience. Le temps de stimulation variait en fonction de l'expérience, étant de 24 h si les niveaux d'expression de protéines étaient l'objet d'analyse, ou si l'objectif était d'étudier l'activité enzymatique de la FAS. Pour analyser la phosphorylation de la protéine Src

kinase, qui intervient dans la cascade de signalisation, le temps d'incubation a été de cinq minutes (Kong, 2003).

Pour la stimulation des cellules, l'insuline a été employée à une concentration finale de 100 nM dans le milieu de culture, la T3 à 1.6 μ M et le C6 à 1 μ M (Akpa, 2010). Le Tetrac, un antagoniste du récepteur β -intégrine, qui empêcherait la possible liaison de T3 au récepteur, a été utilisé à une concentration finale de 100 nM (Lin, 1996). Le PP1 et/ou le PP2, des inhibiteurs spécifiques de la phosphorylation de Src kinase, ont été utilisés à une concentration finale de 20 μ M (Kong, 2003). Dans les deux cas (Tetrac, PP1-PP2), les cellules ont été incubées 30 min avec du milieu contenant la substance. Par la suite, du milieu contenant les hormones a été ajouté directement pour enclencher la stimulation, de façon à conserver l'antagoniste en place. Le Tetrac, le PP1 et le PP2 ont été dilués dans du DMSO, et le DMSO a aussi été incorporé dans la condition contrôle.

2.5 Mesure de l'activité enzymatique de la FAS

L'activité enzymatique de la FAS a été mesurée à 340 nm. Cette technique évalue la disparition du NADPH utilisé par l'enzyme pour la conversion de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA en acides gras saturés à longues chaînes (Radenne, 2008). Après la stimulation hormonale de 24 h, deux à trois plaques de cellules traitées ont été récoltées dans du PBS 1X. Après une brève centrifugation, les cellules ont été résuspendues dans du tampon d'homogénéisation froid (0.1 M KPi, pH 7.0; 3 mM

EDTA, pH 7.0 et 1 mM DTT). Les cellules ont ensuite été transférées dans l'homogénéisateur Dounce pour obtenir les extraits cytosoliques. Les lysats ont été centrifugés à 3 000 rpm pour 15 min à 4°C. L'activité est mesurée en mélangeant dans une cuvette de quartz 50 µL de lysat cellulaire, 940 µL de tampon d'essai (0.1 M KPi, pH 7.0; 3 mM EDTA, pH 7.0; 1 mM DTT; 0.0025 mM acétyl-CoA et 0.18 mM NADPH) et 10 µL de malonyl-CoA (0.1 mM concentration finale) pour démarrer la réaction. La DO à 340 nm est ensuite mesurée pendant 10 min à 37°C.

2.6 Test d'immunobuvardage de type Western

Les cellules stimulées ont été lavées deux fois au PBS 1X froid. Elles ont par la suite été collectées dans du tampon de lyse cellulaire contenant des inhibiteurs de protéases (EDTA free complete mini, Roche Diagnostics), 200 µM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 50 mM HEPES pH 7.5; 150 mM NaCl, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% glycérol et 1% Triton X-100. Les cellules ont été lysées dans le tampon de 20 à 30 min sous agitation lente à 4°C. Les échantillons ont été centrifugés à 15 000 rpm pendant 30 min à 4°C et les surnageants collectés. Les concentrations de protéines des échantillons ont été déterminées à l'aide du kit Protein assay de Biorad selon la méthode Bradford. Le dosage a été fait par lecture des absorbances à 595 nm après 5 min d'incubation à température ambiante. Environ 20 µg de protéines de lysats cellulaires ont été mélangés au tampon de chargement (2% SDS, 2% β-mercaptoéthanol, 10% v/v glycérol et 50 mg/ml de bromophénol

bleu dans tampon 0.1 M Tris-HCl, pH 6.8), chauffés à 100°C pendant 5 min, soumis à migration en gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE) dont le pourcentage dépend de la protéine à analyser. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane PVDF (Millipore). La membrane a été bloquée pendant 1 h dans du lait écrémé 5%-TBST. Après trois lavages de 5 min au TBST, la membrane a été incubée avec les anticorps primaires d'intérêt (voir Tableau 2.1 pour origine et dilution) toute la nuit à 4°C. Après trois autres lavages au TBST la membrane a été incubée pendant 45 min à 1 h avec l'anticorps secondaire (Biorad), anti-lapin ou anti-mouse selon le cas, conjugué à l'enzyme peroxydase, et dilué selon les recommandations du manufacturier dans la solution bloquante (voir Tableau 2.1 pour origine et dilution). Par la suite, trois lavages au TBST ont été effectués avant de procéder à l'immunodétection au moyen du kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore), à l'aide du FusionFX.

2.7 Analyses statistiques

Les expériences ont été faites en triplicata au minimum, pour avoir au moins un $n=3$. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes, tenant compte des écarts types des moyennes. Les analyses statistiques ont été faites par analyse des variances par un « Student's test » le test pour les comparaisons multiples. Une différence a été considérée significative lorsque $P \leq 0,05$ pour *; $P \leq 0,01$ pour **; $P \leq 0,001$ pour ***. Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel SigmaPlot 11.0.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Rôle du récepteur β -intégrine dans la régulation de la FAS par la T3.

Dans les dernières années, il a été montré que la T3 active des protéines impliquées dans des cascades de signalisation, comme PI3K et ERK1/2 (Radenne, 2008; Cao, 2009; Gnoni, 2011; Barreiro Arcos, 2011). Nous avons alors décidé d'explorer la participation du récepteur β -intégrine comme possible molécule pouvant être à l'origine de la signalisation intracellulaire induite par la T3. Dans des expériences faites sur des cellules HepG2, nous avons pré-incubé les cellules avec du Tetrac 100 nM pendant 30 min. La T3 a été ajoutée par la suite au milieu de culture. Au bout de 24 h, les cellules ont été lysées. Nous avons testé le niveau d'expression protéique de la FAS par test d'immunobuvardage de type Western.

Nous avons observé une augmentation significative ($p=0.001$) du niveau d'expression de la FAS en présence de l'hormone, pour un $215.0 \% \pm 13.9 \%$ (2.2 fois) par rapport à la condition basale, ce qui est raisonnable si l'on considère les limites de la méthode. Avec l'ajout du Tetrac quand la T3 est aussi dans le milieu, le Tetrac étant un antagoniste des récepteurs β -intégrines qui empêche la liaison de l'hormone, a diminué de manière significative l'expression de la FAS ($p=0.005$) par rapport à la condition comportant la T3, pour un $103.5 \% \pm 12.7 \%$ d'inhibition (figure 3.1). Ces expériences ont été réalisées en triplicata.

Nous avons, par la suite, étudié l'implication du récepteur β -intégrine dans l'activation de l'enzyme, au moyen du test de l'activité enzymatique de la FAS, qui est une mesure directe de son activité physiologique. Pour ce faire, nous avons pré-incubé les cellules HepG2 avec du Tetrac, suivi d'une stimulation de 24 h avec la T3. Les cellules ont été lysées, et l'activité enzymatique de la FAS a été mesurée par la disparition du NADPH du milieu, ayant préalablement ajouté l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA. Nos résultats montrent que la T3 active l'enzyme de $368.3 \% \pm 16.8\%$, 3.7 fois la condition basale, ce qui est significatif ($p \leq 0.001$) (figure 3.2). Ce résultat corréle avec le niveau d'activation de la FAS trouvé par A. Radenne et M. Akpa en présence de T3 (Radenne, 2008; Akpa, 2010). De plus, cela est en accord avec les résultats mesurés sur le niveau d'ARNm (Radenne, 2008), suggérant fortement que la régulation de l'activité de l'enzyme par la T3 est majoritairement transcriptionnelle. L'ajout du Tetrac provoque une chute de l'activation de l'enzyme jusqu'à un $191.2 \% \pm 26 \%$ d'activation. La diminution de l'activité enzymatique a été presque de moitié (1.9) par rapport à la condition T3, avec un coefficient de signification de $p \leq 0.001$ (figure 3.2). Entre les conditions basale et T3-Tetrac il y a eu une différence significative de 91.2% ($p=0.013$) (figure 3.2).

Les résultats d'expression et d'activité de la FAS en présence de Tetrac indiquent que, effectivement, le récepteur β -intégrine induirait une cascade de signalisation en réponse à la T3, régulant l'expression et l'activité de la FAS. De façon indirecte, nous constatons l'existence d'un mécanisme parallèle de régulation, à savoir, le mécanisme génomique, dans lequel la T3 rentrerait directement au noyau de la cellule pour

réguler la transcription des gènes cibles (Yen, 2001), puisque le blocage de la voie non-génomique au moyen du Tetrac n'arrive pas à abolir complètement l'expression, mais surtout l'activité de la FAS dans les cellules hépatiques HepG2 utilisées pour les expériences. Cette observation est en accord avec les études des équipes de Barreiro Arcos et Davis (Barreiro Arcos, 2011; Davis, 2011), ainsi qu'avec l'étude de notre équipe publiée en 2008 (Radenne, 2008).

3.2 Rôle de la protéine Src kinase dans la voie de régulation de la FAS induite par la T3.

Certaines études ont montré que la β -intégrine activerait la protéine Src kinase dans le processus de migration cellulaire (Schaefer, 1997; Klemke, 1997), en réponse aux facteurs de croissance et pour l'attachement de la cellule à la matrice extracellulaire dans des ostéoclastes (Faccio, 2003). Nous avons voulu étudier si dans un contexte de stimulation par la T3 dans des cellules hépatiques, les Src kinases seraient aussi impliquées en aval du récepteur β -intégrine. Pour tester cette hypothèse, nous nous sommes servis de PP1 et de PP2, des inhibiteurs spécifiques de l'activité des Src kinases. Dans un premier temps, nous avons évalué l'inhibition de la phosphorylation de la Src kinase en présence de PP1 et PP2. Les cellules HepG2 ont été pré-incubées pendant 30 min avec les inhibiteurs à une concentration finale de 20 μ M (Kong, 2003). Une stimulation de 5 min avec la T3 a par la suite été effectuée. Les cellules ont été lysées. La protéine Src kinase phosphorylée au résidu tyrosine 416 (marqueur d'activation de l'enzyme) et Src kinase totale ont été détectées à l'aide d'anticorps

spécifiques par test d'immunobuvardage de type Western. Nous avons observé une augmentation significative du niveau de phosphorylation de la protéine en présence de la T3 qui a atteint $176.1 \% \pm 17.6 \%$ par rapport à la condition basale ($p=0.012$) (figure 3.3), comme attendu (Faccio, 2003; Schaefer, 1997; Klemke, 1997). Quand les inhibiteurs ont été ajoutés nous avons observé une diminution significative de la phosphorylation de la protéine d'environ $65.0 \% \pm 11.3 \%$ ($p=0.036$), allant jusqu'au niveau de base (figure 3.3).

Nous avons, par la suite, évalué les effets du blocage de l'activité de la Src kinase sur la FAS, en réponse à la stimulation par la T3. En ce qui concerne les niveaux d'expression de la FAS, testés par immunobuvardage de type Western, nous obtenons une augmentation significative ($p=0.004$) de l'expression de la FAS en présence de la T3 comme préalablement montré, représentant 1.44 ± 0.07 fois la condition basale (figure 3.4). Avec l'ajout de PP1 et de PP2 au milieu de culture, nous observons une tendance claire à la diminution de l'expression de la FAS ($p=0.054$) qui pourrait mieux se manifester en augmentant le nombre des répétitions de l'expérience, qui a été, par ailleurs, faite en triplicata. Le traitement avec le PP1 et le PP2 en présence de la T3, a ramené l'expression de la FAS aux niveaux basaux ($100.2 \% \pm 14.3 \%$), pour un 43.4 % d'inhibition (figure 3.4).

En ce qui a trait aux niveaux d'activité enzymatique de la FAS, nous avons obtenu une augmentation de l'activité en réponse à la stimulation avec la T3, s'élevant en moyenne jusqu'à $231.5 \% \pm 60.3 \%$ comparé à la condition basale (figure 3.5). L'utilisation des inhibiteurs de la Src kinase a eu un effet inhibitoire sur l'activité de

l'enzyme, provoquant une chute jusqu'à $84.7 \% \pm 14.2 \%$ du basal. Or, le niveau de signification de ces résultats reste à discuter, n'étant pas aussi satisfaisant que ceux espérés. D'après ce qui a été rapporté dans la littérature impliquant la Src kinase comme protéine de signalisation stimulée par la T3 dans le contexte d'une action non-génomique de celle-ci (Cao, 2009; Lei, 2004), ainsi que nos résultats pour l'expression de la FAS en présence de PP1 et de PP2 et de T3, nous considérons que l'augmentation du nombre de n pourra éclaircir la tendance de l'effet du blocage de la Src kinase sur l'activité de la FAS.

Afin de confirmer l'activation de la Src kinase en aval du récepteur β -intégrine suite à la stimulation par la T3, nous avons pré-incubé des cellules HepG2 avec le Tetrac 100 nM pendant 30 min, suivi d'une stimulation avec la T3 pendant 5 min. Les cellules ont par la suite été lysées, et les protéines cytosoliques soumises au test d'immunobuvardage de type Western, spécifique pour la Src kinase phosphorylée et la Src kinase totale. Les résultats montrent une augmentation significative ($p \leq 0.001$) de la phosphorylation de la Src kinase au résidu tyrosine 416 en présence de la T3, pour un $143.7 \% \pm 4.0 \%$ d'activation de la protéine par rapport à la condition basale (figure 3.6). Le traitement avec le Tetrac en présence de la T3 a fait chuté les niveaux de phosphorylation de la Src kinase de façon significative ($p = 0.018$) pour un $53 \% \pm 8.3 \%$ de diminution par rapport à la condition de stimulation avec la T3 (figure 3.6), pour revenir au niveau de base. Ces résultats révèlent qu'il existerait une relation entre le récepteur β -intégrine et la Src kinase dans les cellules HepG2 suite à la stimulation avec la T3.

L'ensemble de résultats présentés jusqu'ici pointent vers la participation de la protéine Src kinase dans la cascade de transduction de signal déclenchée par la T3, ayant l'origine dans le récepteur β -intégrine au niveau de la membrane plasmique. La Src kinase se situerait de façon très probable en aval du récepteur.

3.3 Rôle du C6 dans la régulation de la FAS.

Il a été décrit que le C6 était capable de diminuer l'activité enzymatique de la FAS de façon importante en présence de T3 et d'insuline, soit de 40 à 50 % (Akpa, 2010), et ce sans écarter la possibilité qu'il pourrait aussi exercer son action en présence de T3 ou d'insuline séparément. Nous avons étudié, l'effet du C6 sur l'activation de la Src kinase, un des éléments de la voie induite par la T3, afin d'explorer un possible point de régulation du C6 sur la FAS.

L'insuline, tout comme la T3, est capable d'activer la phosphorylation des kinases Src (Thomas et Brugge, 1997). Nous avons testé l'activation de la Src kinase sur des cellules HepG2, qui ont été incubées pendant 5 min avec ou sans la T3 (1.6 μ M), et/ou l'insuline (100 mM), en présence ou non de C6 (1 μ M). L'activation de la Src kinase a été évaluée au moyen du test d'immunobuvardage de type Western. Nous avons obtenu une augmentation significative de la phosphorylation de la protéine par rapport à la condition basale quand les cellules ont été incubées avec la T3 ($p \leq 0.001$) pour un $147.1 \% \pm 1.9 \%$ (figure 3.7). Quand le C6 a été ajouté au milieu, il s'est produit une légère diminution de la phosphorylation de la Src kinase, pour environ $10 \% \pm 0.7 \%$ de diminution par rapport à la condition T3 ($p = 0.018$). Dans le cas où

l'insuline et la T3 ont été ajoutées ensemble au milieu de culture nous obtenons comme attendu, une augmentation significative de l'activation de la Src kinase ($p=0.005$), qui atteint 1.7 ± 0.13 fois le niveau basal. L'ajout du C6 aux deux hormones dans le milieu de culture n'a pas eu d'effet sur l'activation de la Src kinase. Le pourcentage de diminution de la phosphorylation de la Src kinase que nous observons en présence de T3 et de C6, ne s'avère pas suffisant pour expliquer l'inhibition de 40 à 50% de la FAS que l'on observe en présence du C6, surtout si nous considérons le fait que la Src kinase est située en amont de la cascade de signalisation qui fait l'objet de notre étude. De plus, contrairement à ce qui était attendu, nous n'observons pas d'inhibition quand l'insuline et la T3 ont été ajoutés ensemble avec le C6, comparé à la condition de stimulation avec les deux hormones. Afin de confirmer les observations faites sur des cellules HepG2, nous avons répété l'expérience dans des cellules primaires de foie de souris C57BL/6 âgées de 4 mois. Nous avons obtenu la même tendance (figure 3.8).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La FAS est une enzyme qui joue un rôle clef dans la lipogenèse *de novo* car elle synthétise les acides gras saturés de 16 et 18 carbones, les principaux constituants des triglycérides stockés dans le tissu adipeux. La lipogenèse, quant à elle, est impliquée dans le développement de l'obésité. Des études ciblant la FAS ont essayé de bloquer son action de synthèse d'acides gras saturés à longues chaînes, par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique, le C75. Les résultats de l'étude effectuée sur des souris, ont montré une importante perte de poids associée à une diminution de la prise alimentaire (Loftus, 2000). En effet, les recherches avec le C75 ont été abandonnées puisque l'inhibiteur générait des effets anorexiques considérables par modulation des neuropeptides impliqués dans le contrôle de l'appétit (Shimokawa, 2002). Or, cette étude a mis en évidence l'importance de la FAS dans le contexte du développement de l'obésité, étant une enzyme qui serait impliquée à la fois dans la lipogenèse et dans le contrôle de la prise alimentaire.

La FAS est régulée positivement par les hormones T3 et insuline. Les études de A. Radenne ont mis en évidence que la T3 était capable d'activer la FAS *via* deux mécanismes. L'un appelé génomique, pour la liaison de l'hormone au complexe TR/RXR sur le TRE du promoteur du gène de la FAS au niveau du noyau, constaté par des expériences de retard sur gel (Radenne, 2008). La liaison de l'hormone au complexe TR/RXR entraînerait probablement la dissociation des cofacteurs NCoR,

SMRT, HDAC1 et de mSin3 qu'en conditions basales se lient à l'ADN réprimant la transcription, permettant ainsi l'activation transcriptionnelle du gène.

L'étude de Radenne et al. a aussi montré que la T3 était capable d'activer des protéines appartenant à des cascades de signalisation intracellulaire, notamment PI3K et ERK1/2, par un mécanisme appelé non génomique. Le mécanisme par lequel la PI3K pourrait être activée restait à déterminer.

Il a été décrit que dans certaines conditions la PI3K était la cible de la protéine Src kinase (Lei, 2004; Cao X, 2009). La Src kinase, à son tour, a été rapportée comme une protéine appartenant à la cascade de signalisation impliquant le récepteur β -intégrine (Faccio, 2003; Schliess, 2004; Thomas et Brugge, 1997). Nous avons alors décidé de tester la participation de ce récepteur comme molécule transductrice du signal de la T3 permettant la modulation de la FAS.

Nos résultats appuient l'hypothèse où la β -intégrine pourrait agir comme récepteur déclenchant une cascade de signalisation en réponse à la T3. En effet, nous avons vu que l'expression de la FAS était inhibée de moitié dans cellules HepG2 traitées avec le Tetrac, un antagoniste du récepteur β -intégrine, ainsi qu'avec la T3, par rapport à la stimulation avec la T3, où l'expression de l'enzyme a atteint deux fois le niveau basal (figure 3.1). Cette inhibition partielle est en accord avec le fait que la T3 agirait par un mécanisme à la fois génomique et non génomique. Le fait de bloquer le récepteur β -intégrine au moyen du Tetrac et en présence de T3, a eu un impact de nature inhibitrice sur l'activité et l'expression de la FAS, suggérant des événements intracellulaires se produisant *via* le récepteur β -intégrine.

Le récepteur β -intégrine est capable d'activer des protéines de signalisation intracellulaire, comme les Src kinases, FAK, entre autres. Nous pensons que dans ce cas, il active une cascade de signalisation qui aboutirait à réguler la transcription de la FAS au niveau d'un élément de réponse TRE sur le promoteur de la FAS. De façon consistante avec ce premier résultat, l'activité enzymatique de la FAS induite par la T3 a été inhibée quand le Tetrac a été ajouté au milieu de culture, toujours en présence de T3 (figure 3.2). Les valeurs relatives de stimulation de la FAS par la T3 pour cette expérience d'activité enzymatique ont été plus élevées que celles correspondant à l'expression de la FAS en présence de T3. L'essai d'activité enzymatique semble être beaucoup plus sensible et la mesure plus quantitative que le test d'immunobuvardage de type Western, d'après les observations faites année après année dans notre laboratoire (données non montrées). Il faut aussi tenir compte que l'on teste l'effet du Tetrac à différents niveaux, expression de l'enzyme et fonctionnalité de l'enzyme, et par le fait même il pourrait y avoir une différence de la réponse relative à la stimulation par la T3, mais malgré ces différences la tendance est la même. En effet, les limites de la méthode du test d'immunobuvardage expliquent pourquoi nous n'obtenons pas une stimulation en présence de T3 aussi importante que celle de l'activité enzymatique, et c'est la raison pour laquelle au moment d'émettre une conclusion nous donnons plus de poids aux résultats de l'activité enzymatique. Concernant la condition où le Tetrac et la T3 ont été utilisés simultanément, l'activité de la FAS s'est vue diminuée de moitié en comparaison à la stimulation avec la T3. Le fait que l'activité de la FAS ne chute pas aux niveaux

basaux démontre bien l'existence de la voie génomique de la T3 sur la régulation de la FAS. Ces deux mécanismes d'action de la T3 coexisteraient à l'intérieur de la cellule.

En ce qui concerne la Src kinase, la stimulation des cellules HepG2 pendant 5 min avec la T3 en présence de Tetrac, qui bloque le récepteur β -intégrine, a ramené au niveau basal la phosphorylation de Src kinase par rapport à la stimulation avec la T3 (1.5 fois) (figure 3.6). Ces résultats pointent vers la participation de cette protéine en aval du récepteur β -intégrine dans la chaîne de réaction déclenchée par la T3. Cela vient confirmer des observations précédentes qui rapportaient que la Src kinase se situait en aval de la chaîne de réaction de la β -intégrine (Faccio, 2003; Schliess, 2004; Thomas et Brugge, 1997). Il a été rapporté l'interaction directe entre le récepteur β -intégrine et la Src kinase dans cellules de la lignée murine CHO, où les β -intégrines co-précipitaient avec la Src kinase et les immunoprécipités de β -intégrines montraient une activité Src kinase spécifique (Arias-Salgado, 2003). Dans des cellules de muscle lisse surexprimant la β -intégrine, il a été observé une association β -intégrine-Src kinase par co-précipitation de deux protéines (Courter, 2005). D'autres auteurs ont rapporté que l'intégrine activée induirait l'autophosphorylation de FAK (*Focal adhesion kinase*) créant un site d'ancrage pour le domaine SH2 de la Src kinase, qui a son tour phosphoryle d'autres résidus de tyrosine sur FAK, maximisant ainsi l'activité kinase du complexe FAK-Src et créant d'autres sites supplémentaires d'interaction de protéines (Huvneers et Danen, 2009; Mitra et Schlaepfer, 2006). Le dernier, concerne des études sur la signalisation *via* le récepteur β -intégrine dans le

contexte de l'adhésion cellulaire. Les substrats de la β -intégrine suite à d'autres stimuli ont été beaucoup moins documentés. Nonobstant, l'étude de la structure protéique de FAK montre un domaine de liaison aux intégrines, tandis que la structure protéique de la famille des Src kinases ne comporte pas un tel domaine (Thomas et Brugge, 1997). Pourtant, le fait que la Src kinase ne comporte pas un domaine de liaison aux β -intégrines, ne devrait pas empêcher un possible rôle de Src comme substrat de l'intégrine. Dans notre cas, nous ne nous avançons pas à dire que la Src kinase serait la cible directe de la β -intégrine, puisque nous n'avons pas réalisé d'expériences le testant directement. Nous dirons plutôt que, d'après nos résultats, la Src kinase se situe en aval du récepteur β -intégrine dans la cascade de signalisation générée par la T3.

L'incubation de cellules HepG2 avec la T3, le PP1 et le PP2 pendant 5 min a fait diminuer la phosphorylation de la Src kinase de 65 % par rapport à la stimulation pendant 5 min avec la T3 (figure 3.3). Le fait que les résultats ne soient pas plus drastiques pourrait être dû au fait que probablement il y aurait d'autres protéines kinases de la famille des Src kinases, qu'assumeraient le rôle de la Src kinase en son absence de fonction. Rappelons que cette famille de protéines kinases est composée de neuf représentants: Src, Fyn, Yes, Yrk, Blk, Fgr, Hck, Lck, Lyn, qui partagent des régions hautement conservées, et ont des fonctions quelques fois redondants à l'intérieur des cellules (Thomas et Brugge, 1997). D'un autre côté, pour nos expériences nous avons pré-incubé les cellules avec les inhibiteurs pendant 30 min. Il serait recommandable d'allonger ladite période à une heure avant la stimulation

hormonale avec la T3, cela pourrait donner des résultats plus évidents au niveau de l'inhibition de la Src kinase.

Dans nos tests d'immunobuvardage de type Western nous avons remarqué une surexpression de la Src kinase totale en présence des inhibiteurs PP1 et PP2, et cela associé à nos expériences de pré-incubation de 30 min avec les inhibiteurs, suivi d'une stimulation de 5 min avec la T3. Étant donné le temps tellement court où l'expérience s'est déroulée, nous considérons qu'une hypothèse visant la régulation transcriptionnelle de la protéine pourrait être écartée. Les membres de la famille des Src kinases contiennent un domaine M, de myristoylation, aussi appelé domaine SH4 (figure 1.8) (Dehm et Bonham, 2004). Dans des cellules COS-1 il a été rapporté qu'entre 80 et 90 % de la Src kinase se trouvait dans la fraction membranaire (Patwardhan, 2010). La myristoylation de Src exercerait un effet positif sur son activité kinase, et régulerait l'ubiquitination et la dégradation de la protéine. La fixation d'un ligand ou d'une autre protéine pourrait causer un changement d'état de la protéine, résultant en l'association ou la dissociation de la membrane (Patwardhan, 2010). Nous pensons que l'ajout des inhibiteurs au milieu de culture a affecté la myristoylation de la protéine. Il a été rapporté que le PP1 est capable de s'insérer dans le site de fixation de l'ATP dans le centre catalytique des kinases de la famille Src (Liu, 1999). L'ajout de PP1 et de PP2 déplacerait l'ATP ce qui pourrait nuire la stabilité thermodynamique de la protéine, provoquant un changement de conformation de la protéine qu'affecterait l'encrage de la Src aux membranes. Cela ferait en sorte que l'on récupère ces protéines dans les extraits cytosoliques, tandis

que dans les conditions ne présentant pas de PP1 ou de PP2, une partie des Src resteraient liées aux membranes. Il faut préciser que l'anticorps utilisée pour ces expériences reconnaît non seulement la Src kinase, mais au moins cinq autres membres de cette famille, dont Lyn, Fyn, Lck, Yes and Hck (information trouvé sur la fiche de l'anticorps, Cell Signaling), pouvant elles aussi être myristoylées et affectées en présence de PP1 et PP2, ayant comme résultat l'amplification du signal.

Dans le but d'évaluer la participation des Src kinases dans la régulation du gène de la FAS, nous avons incubé les cellules avec PP1, PP2 et/ou la T3, cela pendant 24 h. Le blocage des Src kinases par les inhibiteurs PP1 et PP2 en présence de T3, a provoqué une réduction de l'expression de la FAS (figure 3.4), ainsi que de son activité enzymatique (figure 3.5) par rapport à l'incubation avec T3. Malgré l'absence de signification statistique entre les conditions T3 et T3-PP1-PP2 dans l'expression de la FAS, nos résultats montrent une tendance marquée ($p=0.054$) (figure 3.4) à la participation de cette protéine de signalisation dans la régulation de l'expression du gène de la FAS. L'expérience de l'activité enzymatique de la FAS en présence de PP1 et de PP2 (figure 3.5) a été caractérisée par le même phénomène, où l'on observe une forte tendance à la participation de Src kinase dans la régulation de la FAS, mais cette tendance n'atteint pas non plus la signification statistique. Le problème, nous en sommes convaincus, viendrait du fait que l'inhibition de l'activité Src n'est pas suffisante en présence des inhibiteurs PP1-PP2. Cela a été, d'ailleurs, l'objet d'étude de certains groupes de recherche qui ont proposé le changement des inhibiteurs PP1-PP2 par une combinaison de PP1-PP2-SU6656 (Bain, 2003), ou par l'inhibiteur

AP23846 (Summy, 2005). Ces inhibiteurs ou combinaisons d'eux auraient probablement des résultats plus évidents, statistiquement significatifs, reflétant les rôles des Src kinases dans la régulation de la FAS en réponse à la T3. L'augmentation de la taille de l'échantillon (nombre de n) pourrait, par ailleurs, consolider les tendances que nous observons à présent, concernant les expériences où le PP1 et le PP2 ont été impliqués, en plus de ce qui a été déjà proposé par rapport au temps de pré-incubation.

Donc, suite à la stimulation par la T3 des cellules HepG2, le récepteur β -intégrine semble déclencher une cascade de signalisation impliquant entre autres la protéine de signalisation Src kinase. Il a été bien décrit dans la littérature la participation de l'enzyme PI3K à la régulation de la FAS, par modulation du facteur de transcription SREBP-1c, comme résultat de la voie PI3K/Akt (Gnoni, 2012; Mounier et Posner, 2006; Ribaux et Iynedjian, 2003). L'activation de la Src kinase et de la PI3K sous les mêmes conditions a également été rapportée suite à la stimulation par la T3, dans cellules neuronales et dans des cellules alvéolaires épithéliales de rat (Lei, 2004; Cao X, 2009). Il resterait alors à confirmer dans le contexte de cellules HepG2, que la Src kinase est capable d'activer la PI3K suite à une stimulation par la T3. Pour ce faire, on pourra se servir d'un essai mesurant l'activité kinase de PI3K par immunoprécipitation de la sous-unité régulatrice de PI3K p85 (Mounier, 2006) et cela suite à une incubation des cellules HepG2 avec l'inhibiteur de Src kinase choisit ainsi qu'avec ou sans T3.

Ici nous avons montré que l'hormone T3 serait capable d'activer une cascade de signalisation intracellulaire au moyen du récepteur β -intégrine et que la protéine Src kinase fait partie de cette cascade de signalisation en aval du récepteur. Ces travaux, qui concernent l'action non-génomique de l'hormone thyroïdienne, viennent s'ajouter à d'autres qui ont été fait dans les dix dernières années, et qui ont révolutionné les concepts classiques du mécanisme d'action de la T3. La recherche fondamentale dans ce champ de connaissances est incontournable si l'on veut mieux comprendre les maladies métaboliques liées à l'obésité, puisque l'hormone T3 joue un rôle important dans la régulation du métabolisme et le contrôle de la dépense énergétique de l'organisme, mais aussi pour certains cancers reliés aux glandes thyroïdes.

Les travaux examinant l'effet de l'hexanoate sur la régulation de la FAS publiés par M. Akpa ont montré que l'hexanoate était capable d'inhiber l'activité de la FAS en présence d'insuline et de T3 (Akpa, 2010). D'autres expériences réalisées dans notre laboratoire indiquaient que le C6 inhibait, bien qu'à des faibles taux, la phosphorylation de la protéine ERK1/2 (Point, 2010), en présence de T3 et insuline. Nous avons alors étudié si l'effet du C6 expliquant le résultat sur ERK1/2 pouvait être dû à une action du C6 sur la Src kinase, situé plus en amont. Nos résultats sur la Src kinase en présence du C6 et de deux hormones ne semblent pas indiquer une action de C6 au niveau de cette protéine. L'ajout du C6 au milieu de culture contenant la T3 et l'insuline n'a pas réussi à diminuer le niveau de stimulation de la Src kinase provoqué par les deux hormones, et ce dans des cellules HepG2 (figure

3.7) aussi bien que dans des cellules primaires de foie de souris (figure 3.8). Si la protéine Src kinase, qui se trouve assez en amont des cascades de signalisation, n'est pas impliquée dans l'action de C6, il est très probable que l'action exercée par le C6 se produise plus en aval, sur une des molécules communes aux cascades de signalisation à la T3 et à l'insuline. Il se pourrait que le C6 cible plus directement ERK1/2 qui est activé par la T3 et l'insuline (Radenne, 2008) pouvant aboutir à l'inhibition partielle de la FAS.

Il a été rapporté en 2009 que la protéine ERK1/2 de la cascade des MAPK était capable de colocaliser avec le TR au niveau du cytosol, pour induire sa phosphorylation et sa migration vers le noyau de la cellule (Cao HJ, 2009). Selon les travaux de Radenne et al. (2008), la protéine ERK1/2 est activée en présence de T3 dans les hépatocytes modulant l'expression de la FAS (Radenne, 2008). L'activation de ERK1/2 a aussi été décrite suite à la stimulation par l'insuline (Point, 2010; Radenne, 2008; Saltiel et Kahn, 2001). Puisque la protéine ERK est activée autant en présence d'insuline que de la T3, il s'avère pertinent de tester l'influence du C6 sur le processus de translocation du TR vers le noyau impliquant ERK. Nous pourrions suivre la localisation du TR du cytoplasme vers le noyau à l'aide des techniques de microscopie confocale en utilisant un anticorps spécifique couplé à un fluorophore. La co-localisation avec des protéines spécifiques du noyau ou du cytosol pourra être évaluée par immunoprécipitation en utilisant des fractions cytosolique et nucléaire à chaque fois (Cao HJ, 2009). Les expériences incluraient les conditions avec et sans le

C6 pour évaluer son effet sur le processus de translocation du TR vers le noyau de la cellule.

Le C6 pourrait aussi agir au niveau de la phosphorylation du récepteur β -intégrine, tout en amont de la cascade de signalisation de la T3. Or, cette hypothèse semble moins intéressante du fait qu'une inhibition au niveau de la β -intégrine impliquerait principalement les effets de la T3, tandis que l'insuline pourrait pour sa part activer la signalisation de façon indépendante. De plus, comme nos travaux et ceux d'autres laboratoires suggèrent que la Src est situé en aval des récepteurs β -intégrines, l'effet du C6 sur le récepteur est improbable.

Le C6 pourrait aussi avoir un effet direct sur PI3K qui est activée par la T3 et l'insuline. Pour tester cette hypothèse nous pouvons encore nous servir d'un essai de l'activité kinase de la sous-unité p85 de PI3K (Kong, 2000). Il faudrait incuber préalablement les cellules HepG2 avec la T3 et l'insuline avec ou sans C6. Nous considérons qu'un effet du C6 sur ce point des cascades de signalisation s'avère très probable mais reste à démontrer.

L'action du C6 sur l'hétérodimère TR/RXR sur le TRE de la FAS a également été explorée (Point, 2010). Les résultats montrent une diminution du dimère TR/RXR en présence de C6 et de deux hormones, par rapport à la condition de stimulation avec les deux hormones. Les travaux de Thurmond et al. concernant l'action de l'hexanoate et de l'octanoate sur le gène de l'enzyme malique (Thurmond, 1998) ont pourtant montré que les MCFAs n'affectait pas l'affinité du TR par le TRE, ni empêchait la fixation de la T3 sur son récepteur nucléaire. D'après leurs résultats le

C6 agirait par inhibition de la fonction trans-activatrice du TR, au moyen de la modulation d'un facteur intermédiaire, probablement un co-répresseur ou un co-activateur du TR. Il serait alors recommandable de tester l'effet du C6 immunoprécipitation sur NCoR, SMRT, HDAC1 et mSin3, tous de co-répresseurs, ou encore sur les coactivateurs du TR en présence de T3, SRCs, Trip-1, CBP/p300, et le complexe coactivateur TRAP. Selon les différents travaux effectués à date sur le C6 (Akpa, 2010; Thurmond, 1998), celui-ci agit juste en présence de l'hormone; cela amène à penser que son action s'exercera sur une des molécules activatrices de la transcription. Les études de Thurmond (Thurmond, 1998) ont déjà exploré l'action du C6 sur TRIP, les résultats n'indiquant pas une action sur celui-ci. Il resterait à tester les autres.

Selon Cao HJ, ERK1/2 est capable de stimuler la translocation du TR vers le noyau en présence de T3 (Cao HJ, 2009). Une inhibition d'ERK1/2 par le C6 expliquerait pourquoi l'hétérodimère TR/RXR est moins représenté sur le TRE en présence de C6 et de deux hormones, T3 et insuline, dans les essais de retard sur gel (Point, 2010). Rappelons que la protéine ERK1/2 est activée autant par la T3 que par l'insuline.

Dans une autre perspective d'analyse, les derniers travaux de l'équipe de Semenkovich montrent que la FAS serait susceptible d'une régulation au niveau post-traductionnelle par phosphorylation sur certains résidus aminés de la molécule, soit les résidus S1028 et T1032 du gène humain de la FAS (Jensen-Urstad, 2013). On pourrait alors considérer l'hypothèse que le C6 serait capable de modifier post-traductionnellement la structure de la protéine pour affecter son activité, ou qu'il

affecterait une autre protéine que régule la FAS à son tour. Les travaux de Semenkovich mettent en évidence la participation de mTORC1 dans la phosphorylation de la FAS cytosolique sur les résidus mentionnés après la prise alimentaire. Ladite phosphorylation aurait un effet inhibiteur sur l'activité de la FAS cytosolique provoquant une diminution du facteur de transcription PPAR α , par diminution d'un métabolite produit par la FAS que stimule la production de PPAR α . Ces événements auraient par conséquent l'inhibition de la β -oxydation des acides gras observée pendant la prise alimentaire, où la lipogenèse est favorisée (Jensen-Urstad, 2013).

Le C6 pourrait alors jouer un rôle d'atténuation de la phosphorylation de la FAS, permettant un taux de β -oxydation pendant la prise alimentaire, ce qui expliquerait les bas niveaux de triglycérides sériques observés après la prise alimentaire d'une diète riche en acides gras à chaînes moyennes (Nagao, 2010; Xue, 2009), ainsi que le taux accru d'oxydation de graisses et lipides en général montré dans différentes études (St-Onge, 2003; Papamandjaris, 2000; Binnert, 1998). Pour tester si le C6 aurait un effet directe sur la FAS, on pourrait incuber les cellules HepG2 avec le C6 et les hormones T3 et insuline pendant 30 min (Jensen-Urstad, 2013), suivi d'une extraction de protéines cytosoliques, pour les soumettre à un test d'immunobuvardage de type western pour l'immunodétection de phosho-S-FAS (résidu 1028), phospho-T-FAS (résidu 1032) et FAS total. Également, nous pourrions tester l'effet du C6 sur l'activité enzymatique de la FAS sur une période de 30 min au lieu de 10 min. L'effet allostérique du C6 sur la FAS avait déjà été testé (Akpa, 2010); les résultats ne

semblaient pas indiquer une régulation post-traductionnelle de la FAS par le C6. Cependant dans cette expérience, l'activité enzymatique de la FAS avait été testée immédiatement après l'ajout de l'hexanoate au mélange réactionnel; l'essai de l'activité enzymatique s'est étalé sur 10 min. Il se pourrait que la réalisation d'un essai enzymatique sur 30 min à mode « time course », permette de constater un effet allostérique du C6 sur l'activité enzymatique de la FAS. Il s'avère également pertinent de tester l'effet du C6 sur mTORC1. mTor est directement activé par Akt par phosphorylation ou de façon indirecte par phosphorylation et inhibition de TSC, qui est un inhibiteur naturel de mTor (Dreyer, 2009). L'incubation des cellules HepG2 avec le C6 et les hormones pendant 20 min permettra de détecter si mTor est activé suite au traitement avec le C6 et les hormones par rapport au traitement avec les hormones exclusivement. De plus, il a récemment été montré que la protéine Akt est activée par la T3 dans des cellules PC-12 dérivées d'un phéochromocytome (Barbakadze, 2014), ainsi que dans des cellules cardiaques (Mourouzis, 2013) et de muscle squelettique (Goulart-Silva, 2013). Un résultat préliminaire obtenu dans notre laboratoire semble montrer une inhibition d'Akt en présence de C6, T3 et insuline (Point, 2010). Il serait alors pertinent d'approfondir les études sur Akt.

En somme, nos résultats ainsi que ceux obtenus auparavant semblent indiquer une action du C6 sur une molécule commune au niveau des cascades de signalisation de la T3 et de l'insuline, pour affecter l'activité du complexe transcriptionnel sur le promoteur du gène de la FAS, provoquant une diminution de la transcription du gène. Le C6 pourrait encore utiliser une autre stratégie pour inhiber partiellement l'activité

de la FAS, soit par action sur un élément commun de la cascade de signalisation de la T3 et celle de l'insuline pour inhiber partiellement mTor résultant en une activation suffisante de la FAS capable de maintenir un niveau de PPAR α , et par conséquent un taux d'oxydation des acides gras de la cellule malgré la prise alimentaire, un mécanisme que n'aurait pas besoin de se rendre jusqu'au niveau transcriptionnel pour réguler l'activité de la FAS. Nous pensons, d'ailleurs, que les deux mécanismes pourraient se manifester simultanément. Les différences de niveaux d'activité de la FAS observées entre les expériences du groupe de Semenkovich et le nôtre seraient probablement dues aux conditions de stimulation différentes avec l'insuline; dans notre cas le temps de stimulation a été de 24 h, tandis que l'autre équipe a stimulé les cellules de 0 à 30 min.

Ici nous avons montré que la protéine Src kinase ne serait pas la cible de l'action du C6 aboutissant à l'inhibition partielle de la FAS. D'autres recherches seront nécessaires aux fins d'élucider ses mécanismes d'action.

Les acides gras à chaînes moyennes constituent des molécules prometteuses dans la quête d'un remède contre l'obésité. Dans de nombreuses études cliniques et précliniques, ils ont montré une capacité d'agir sur des indicateurs physiologiques reliés à l'obésité, comme la diminution du poids corporel et du niveau de triglycérides dans le sang durant la période postprandiale, le contrôle de l'appétit, l'augmentation de la sensibilité à l'insuline, pour ne nommer que quelques-uns. On comprend alors l'importance de l'étude de ces acides gras, dans le contexte actuel où il n'y a pas de

solution efficace pour contrer la prise excessive de poids, et que la prévalence de l'obésité continue d'augmenter dans nos sociétés.

CONCLUSIONS

Dans cette étude nous avons montré la capacité de l'hormone T3 de déclencher une cascade de signalisation dans cellules hépatiques, capable de réguler non-génomiquement l'activité de l'enzyme FAS. Nous avons montré que la T3 se sert du récepteur β -intégrine pour transduire son signal à l'intérieur de la cellule, régulant ultimement la transcription des gènes cibles. Dans cette étude nous avons aussi confirmé indirectement que les deux mécanismes d'action de la T3 coexisterait, voire génomique et non-génomique, puisque le blocage du mécanisme non-génomique n'arrive pas à annuler complètement l'expression de la FAS.

D'un autre côté, nous avons mis en évidence que la protéine Src kinase fait partie de la cascade de signalisation déclenchée par la T3 dans les cellules hépatiques. Elle semble se situer en aval du récepteur β -intégrine. En outre, cette protéine de signalisation ne semble pas être la cible du C6 dans son action inhibitoire de la FAS.

ANNEXE

Tableau 2.1 Anticorps et dilutions utilisés pour la détection des protéines par le test d'immunobuvardage de type Western

Protéine (anticorps primaire)	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
FAS	1:1000	Anti-lapin conjugué à HRP	1:5000
Src total	1:1000	Anti-lapin conjugué à HRP	1:5000
P-Src	1:1000	Anti-lapin conjugué à HRP	1:5000
β -actine	1:1000	Anti-souris conjugué à HRP	1:5000
α -tubulibe	1:1000	Anti-lapin conjugué à HRP	1:5000

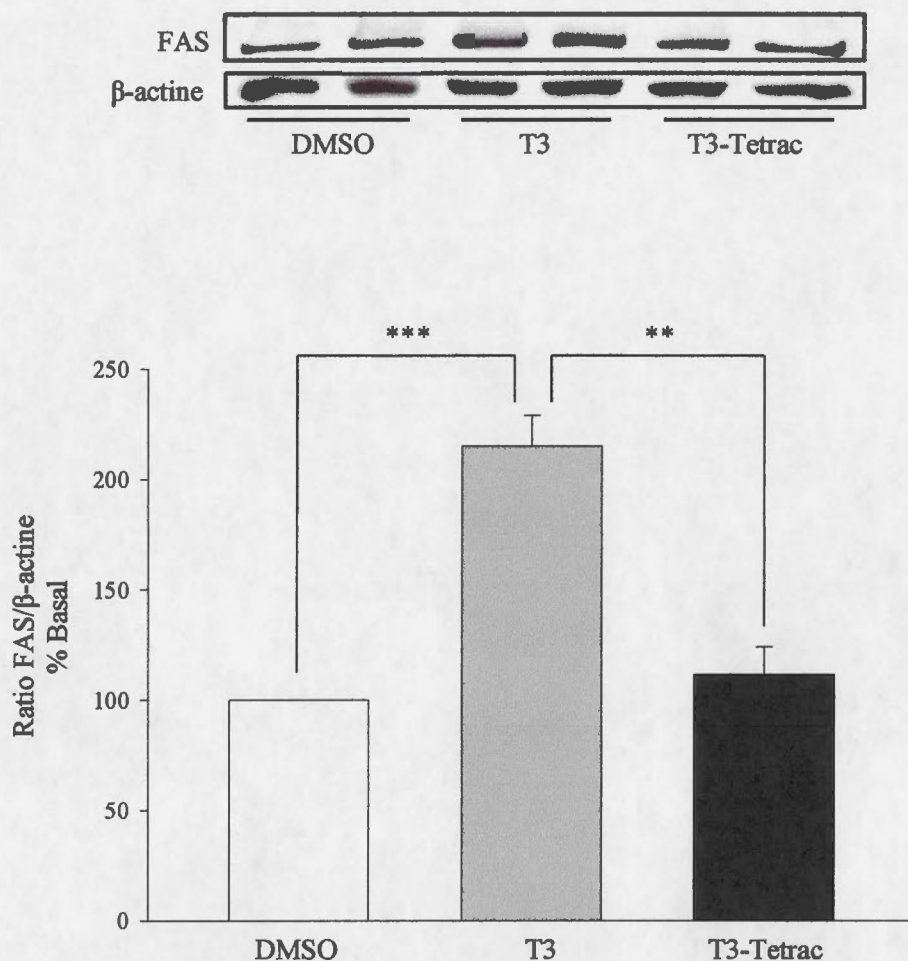


Figure 3.1 Effet du Tetrac sur l'expression de la FAS

Les cellules HepG2 ont été pré-incubées pendant 30 min avec ou sans Tetrac (100 nM), suivi d'une stimulation de 24 h avec ou sans T3 (1.6 μ M). Les cellules ont été lysées. Les protéines cytosoliques ont été séparées par SDS-PAGE 10% et la protéine FAS a été immunodétectée à l'aide d'un anticorps anti-FAS. Les résultats ont été exprimés en pourcentage en fonction de la condition basale (sans traitement), et représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les barres sur les colonnes indiquent la déviation standard. ** ($p \leq 0,01$); *** ($p \leq 0,001$).

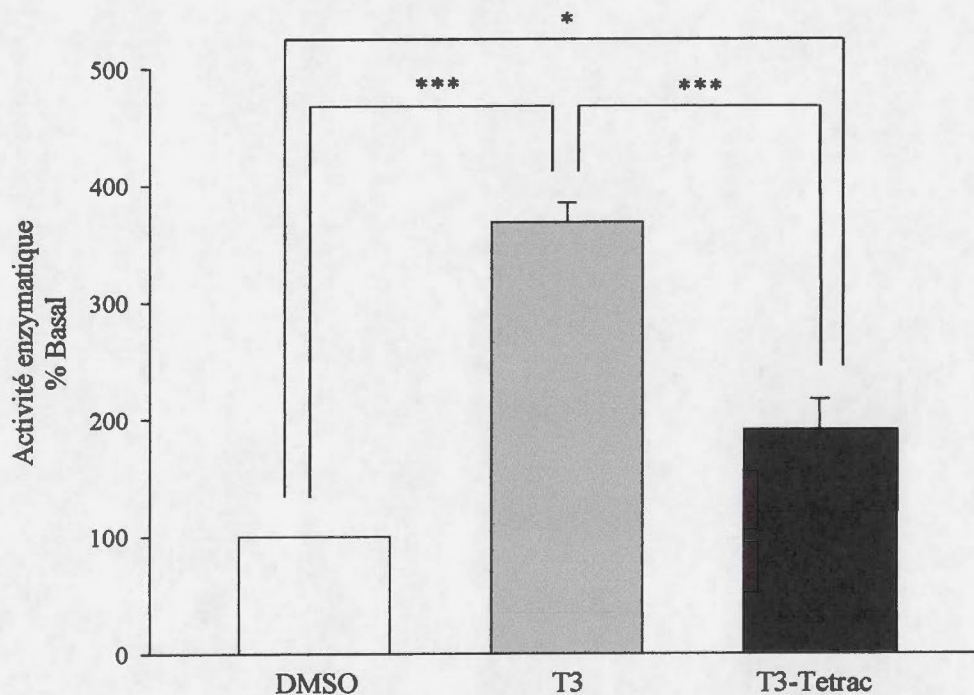


Figure 3.2 Effet du Tetrac sur l'activité enzymatique de la FAS

Les cellules HepG2 ont été pré-incubées pendant 30 min avec ou sans Tetrac (100 nM), suivi d'une stimulation de 24 h avec ou sans T3 (1.6 μ M). Les cellules ont été lysées. L'activité enzymatique a été mesurée selon la méthode décrite à la section 2.4. Les résultats ont été exprimés en pourcentage en fonction de la condition basale (sans traitement). Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les barres sur les colonnes indiquent la déviation standard. *** ($p \leq 0,001$).

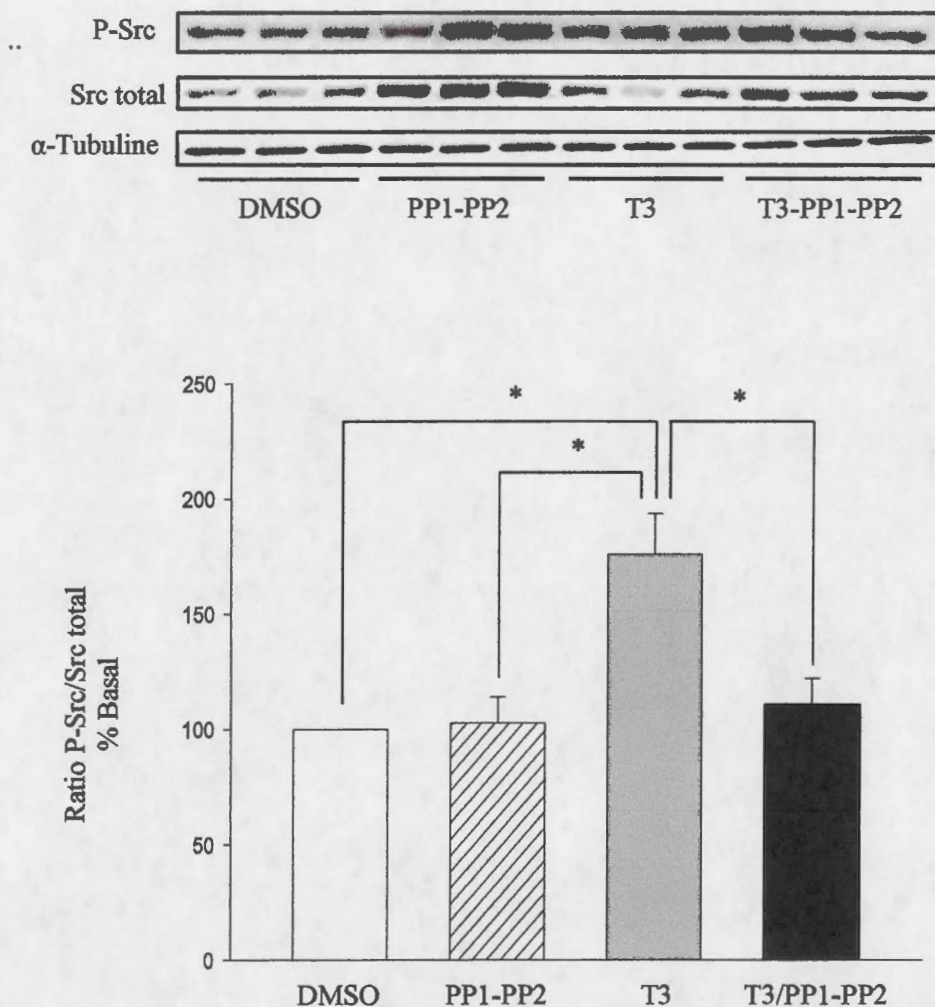


Figure 3.3 Effet de PP1 et de PP2 sur la phosphorylation de Src kinase

Les cellules HepG2 ont été pré-incubées pendant 30 min avec ou sans PP1 et PP2 (20 μ M), suivi d'une stimulation de 5 min avec ou sans T3 (1.6 μ M). Les cellules ont été lysées. Les protéines cytosoliques ont été séparées par SDS-PAGE 10%. La protéine FAS a été immunodétectée à l'aide d'un anticorps anti-FAS. Les résultats ont été exprimés en pourcentage en fonction de la condition basale (sans traitement).

* ($p \leq 0,05$).

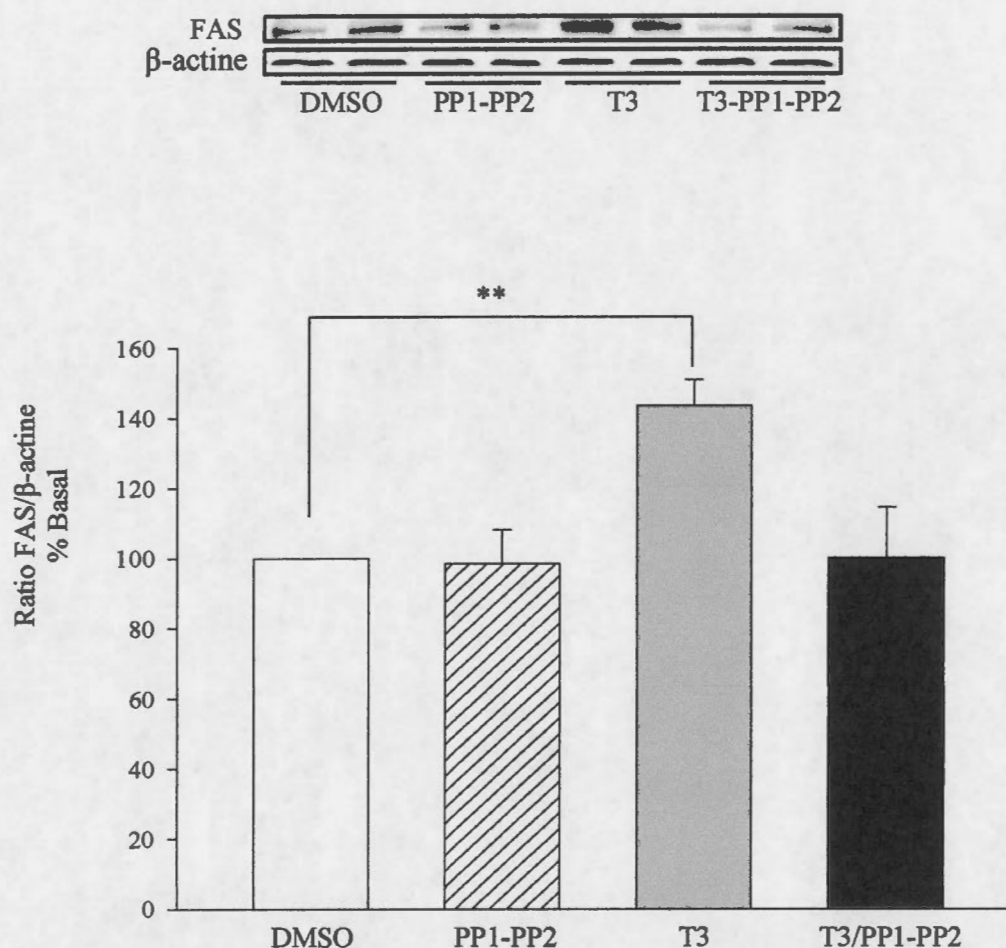


Figure 3.4 Effet de PP1 et de PP2 sur l'expression de la FAS

Les cellules HepG2 ont été pré-incubées pendant 30 min avec ou sans PP1 et PP2 (20 μ M), suivi d'une stimulation de 24 h avec ou sans T3 (1.6 μ M). Les cellules ont été lysées. Les protéines cytosoliques ont été séparées par SDS-PAGE 10%. La protéine FAS a été immunodétectée à l'aide d'un anticorps anti-FAS. Les résultats ont été exprimés en pourcentage en fonction de la condition basale (sans traitement). Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les barres sur les colonnes indiquent la déviation standard. ** ($p \leq 0,01$).

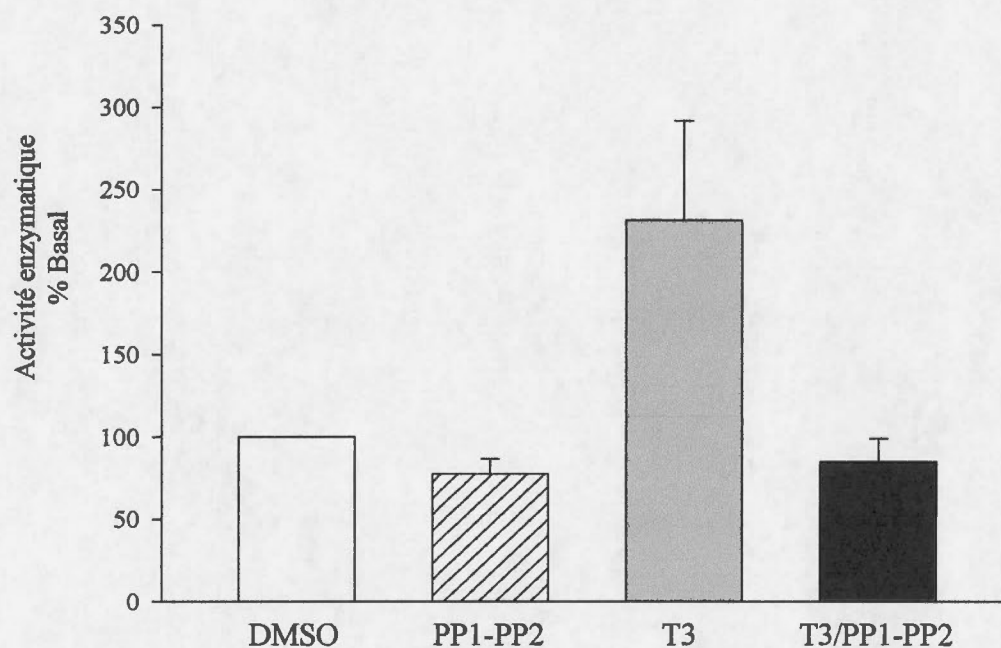


Figure 3.5 Effet de PP1 et de PP2 sur l'activité enzymatique de la FAS

Les cellules HepG2 ont été pré-incubées pendant 30 min avec ou sans PP1 et PP2 (20 μ M), suivi d'une stimulation de 24 h avec ou sans T3 (1.6 μ M). Les cellules ont été lysées. L'activité enzymatique a été mesurée selon la méthode décrite à la section 2.4. Les résultats ont été exprimés en pourcentage en fonction de la condition basale (sans traitement). Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les barres sur les colonnes indiquent la déviation standard.

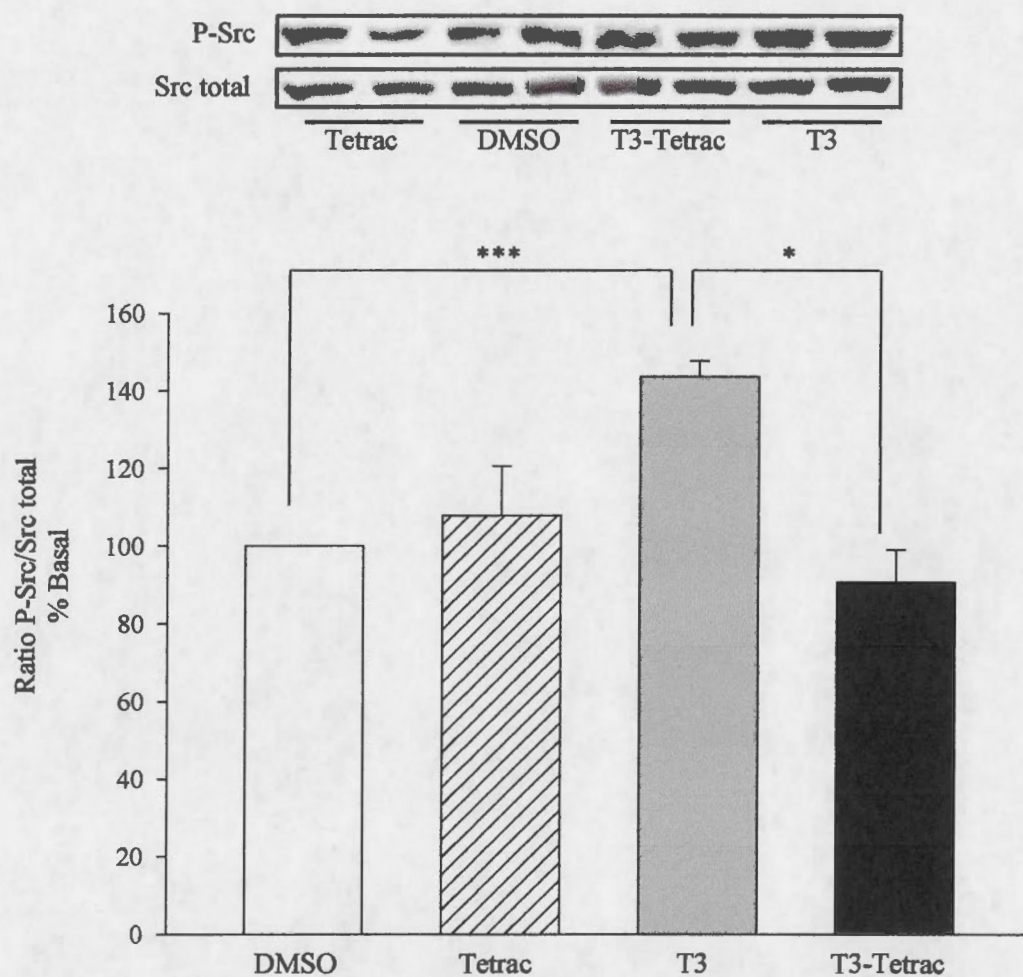


Figure 3.6 Relation entre β -intégrine et Src kinase

Les cellules HepG2 ont été pré-incubées pendant 30 min avec ou sans Tetrac (100 nM), suivi d'une stimulation de 5 min avec ou sans T3 (1.6 μ M). Les cellules ont été lysées et les protéines cytosoliques séparées par SDS-PAGE 10%. Les protéines Src kinase et la Src kinase phosphorylée sur le résidu Y416 ont été immunodétectées à l'aide des anticorps anti-Src et anti-P-Src. Les résultats ont été exprimés en pourcentage en fonction de la condition basale (sans traitement). Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les barres sur les colonnes indiquent la déviation standard. * ($p \leq 0,05$); *** ($p \leq 0,001$).

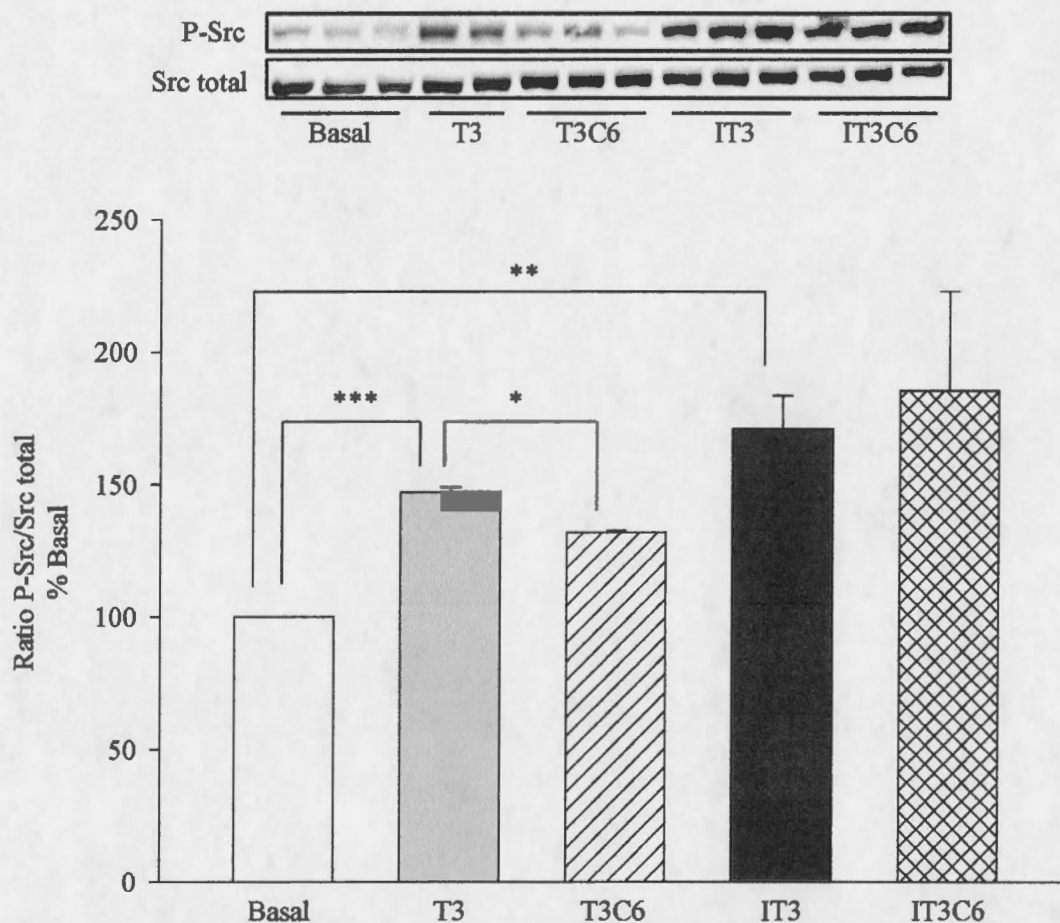


Figure 3.7 Effet du C6 sur la phosphorylation de Src kinase dans cellules HepG2

Les cellules HepG2 ont été incubées pendant 5 min avec ou sans T3 (1.6 μ M), insuline (100 nM) et/ou C6 (1 μ M). Les cellules ont été lysées. Les protéines cytosoliques ont été séparées par SDS-PAGE 10%. Les protéines Src kinase et Src kinase phosphorylée sur le résidu Y416 ont été immunodétectées à l'aide des anticorps anti-Src et anti-P-Src. Les résultats ont été exprimés en pourcentage en fonction de la condition basale (sans traitement). Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les barres sur les colonnes indiquent la déviation standard. * ($p \leq 0,05$); ** ($p \leq 0,01$); *** ($p \leq 0,001$).

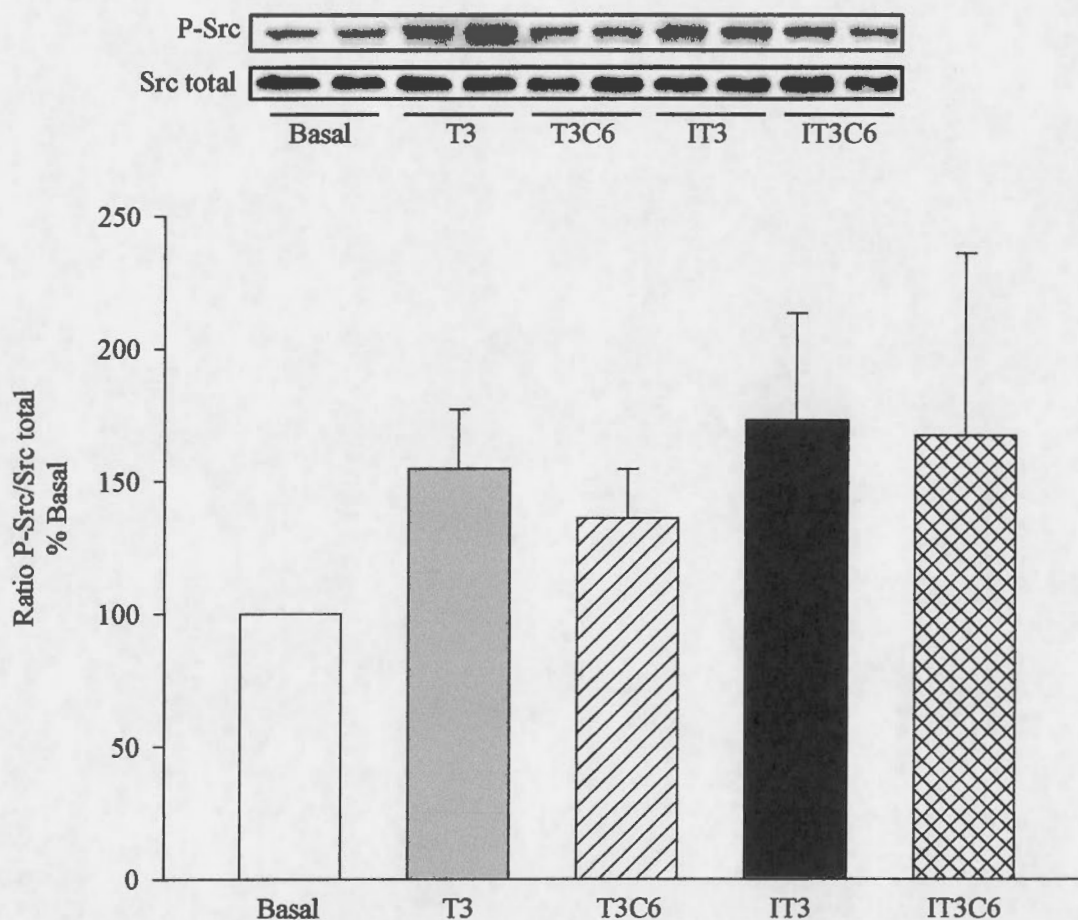


Figure 3.8 Effet du C6 sur la phosphorylation de Src kinase dans cellules primaires de foie de souris C57BL/6

Les cellules primaires de foie de souris C57BL/6 ont été incubées pendant 5 min avec ou sans T3 (1.6 μ M), insuline (100 nM) et/ou C6 (1 μ M). Les cellules ont été lysées. Les protéines cytosoliques ont été séparées par SDS-PAGE 10%. Les protéines Src kinase et Src kinase phosphorylée sur le résidu Y416 ont été immunodétectées à l'aide des anticorps anti-Src et anti-P-Src. Les résultats ont été exprimés en pourcentage en fonction de la condition basale (sans traitement). Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences indépendantes. Les barres sur les colonnes indiquent la déviation standard.

BIBLIOGRAPHIE

- Akpa, M. M., Point, F., Sawadogo, S., Radenne, A., Mounier, C. (2010). Inhibition of Insuline and T3-Induced Fatty Acid Synthase by Hexanoate. *Lipids*, 45, 997-1009.
- An, Z., Wang, H., Song, P., Zhang, M., Geng, X., Zou, M. H. (2007). Nicotine-induced activation of AMP-activated protein kinase inhibits fatty acid synthase in 3T3L1 adipocytes: a role for oxidant stress. *J. Biol. Chem*, 282, 26793-26801.
- Arias-Salgado, E. G., Lizano, S., Sarkar, S., Brugge, J. S., Ginsberg, M. H., Shattil, S. J. (2003). Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 13298-302.
- Asakura, L., Lottenberg, A. M., Neves, M. Q., Nunes, V. S., Rocha, J. C., Passarelli, M., Nakandakare, E. R., Quintão, E. C. (2000). Dietary medium-chain triacylglycerol prevents the postprandial rise of plasma triacylglycerols but induces hypercholesterolemia in primary hypertriglyceridemic subjects. *Am J Clin Nutr*, 71, 701-705.
- Augustine, J. A., Sutor, S. L., Abraham, R. T. (1991). Interleukin 2- and polyomavirus middle T antigen-induced modification of phosphatidylinositol 3-kinase activity in activated T lymphocytes. *Mol Cell Biol*, 11, 4431-4440.
- Back, D. W., Goldman, M. J., Fisch, J. E., Ochs, R. S., Goodridge, A. G. (1986). The fatty acid synthase gene in avian liver. Two mRNAs are expressed and regulated in parallel by feeding, primarily at the level of transcription. *J Biol Chem*, 261, 4190-4197.
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., Cohen, P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J*, 371, 199-204.

- Barbakadze, T., Natsvlishvili, N., Mikeladze, D. (2014). Thyroid hormones differentially regulate phosphorylation of ERK and Akt via integrin $\alpha v \beta 3$ receptor in undifferentiated and differentiated PC-12 cells. *Cell Biochem Funct.*, 32, 282-6.
- Barreiro Arcos, M. L., Sterle, H. A., Paulazo, M. A., Valli, E., Klecha, A. J., Isse, B., Pellizas, C. G., Farias, R. N., Cremaschi, G. A. (2011). Cooperative nongenomic and genomics actions on thyroid hormone mediated-modulation of T cell proliferation involve up-regulation of thyroid hormone receptor and inducible nitric oxide synthase expression. *Journal of Cellular Physiology*, 226, 3208-3218.
- Bevan, P. (2001). Insulin signaling. *J. Cell Sci.*, 114, 1429-1430.
- Binnert, C., Pachiaudi, C., Beylot, M., Hans, D., Vandermander, J., Chantre, P. (1998). Influence of human obesity on the metabolic fate of dietary long- and medium chain triacylglycerols. *Am J Clin Nutr*, 67, 595-601.
- Blake, W. L., Clarke, S. D. (1990). Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat. *J Nutr*, 120, 1727-9.
- Bogazzi, F., Hudson, L. D. et Nikodem, V. M. (1994). A novel heterodimerization partner for thyroid hormone receptor. Peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 269, 11683–11686.
- Borges-Silva, C. N., Fonseca-Alaniz, M. H., Alonso-Vale, M. I. C., Takada, J., Andreotti, S., Peres, S. B., Cipolla-Neto, J., Pithon-Curi, T. C., Lima, F. B. (2005). Reduced lipolysis and increased lipogenesis in adipose tissue from pinealectomized rats adapted to training. *J Pineal Res*, 39178-39184.
- Brix, K., Fuhrer, D., Bierbermann, H. (2011). Molecules important for thyroid hormone synthesis and action – known facts and future perspectives. *Thyroid Res*, 4(1), S9.

- Cao, H. J., Lin, H. Y., Luidens, M. K., Davis, F. B., Davis, P. J. (2009). Cytoplasm-to-nucleus shuttling of thyroid hormone receptor-beta1 (Trbeta1) is directed from a plasma membrane integrin receptor by thyroid hormone. *Endocr Res.* 34(1-2),31-42.
- Cao, X., Kambe, F., Moeller, L. C., Refetoff, S., Seo, H. (2005). Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol*, 19, 102-112.
- Cao, X., Kambe, F., Yamauchi, M., Seo, H. (2009). Thyroid-hormone-dependent activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade requires Src and enhances neuronal survival. *Biochem J*, 424(2),201-9.
- Chakravarthy, M. V., Lodhi, I. J., Yin, L., Malapaka, R. R., Xu, H. E., Turk, J., Semenkovich, C.F. (2009) Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell*, 138, 476-488.
- Cheng, S. Y. (2000). Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Rev Endocr Metab Disord*, 1, 9-18.
- Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (2004). Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11245-11250.
- Courter, D. L., Lomas, L., Scatena, M., Giachelli, C. M. (2005). Src kinase activity is required for integrin alphaVbeta3-mediated activation of nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*, 280, 12145-51.

- Crozier, G., Bois-Joyeux, B., Chanez, M., Girard, J., Peret, J. (1987). Metabolic effects induced by long-term feeding of medium-chain triglycerides in the rat. *Metabolism*, 36, 807-814.
- Davis, P. J., Davis, F. B., Lin, H. Y. (2008). Promotion by thyroid hormone of cytoplasm-to-nucleus shuttling of thyroid hormone receptors. *Steroids*, 73, 1013-1017.
- Davis, P. J. (2011). Integrated nongenomic and genomic actions of thyroid hormone on blood vessels. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, 18, 293-294
- Dehm, S. M., Bonham, K. A. (2004). SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation. *Biochem Cell Biol*, 82, 263-274.
- De Lange, P., Senese, R., Cioffi, F., Moreno, M., Lombardi, A., Silvestri, E., Goglia, F., Lanni, A. (2008). Rapid activation by 3,5,3'-L-triiodothyronine of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/acetyl-coenzyme a carboxylase and akt/protein kinase B signaling pathways: relation to changes in fuel metabolism and myosin heavy-chain protein content in rat gastrocnemius muscle in vivo. *Endocrinology*. 149, 6462-70.
- Diraison, F., Moulin, P. et Beylot, M. (2003). Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab*, 29, 478-485.
- Dreyer, Ch., Raymond, É., Faivre, S. (2009). La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. *Cancéro dig.*, 1, 187-189.
- Faccio, R., Novack, D. V., Zallone, A., Ross, F. P., Teitelbaum, S. L. (2003). Dynamic changes in the osteoclast cytoskeleton in response to growth factors and cell attachment are controlled by $\beta 3$ integrin. *J Cell Biol*, 162, 499-509.

- Fukuda, N. et Ontko, J. A. (1984). Interactions between fatty acid synthesis, oxidation, and esterification in the production of triglyceride-rich lipoproteins by the liver. *J Lipid Res*, 25, 831-42.
- Gandemer, G., Pascal, G., Durand, G. (1980). De novo lipogenesis: kinetics of in vivo incorporation of tritiated water ^3H into fatty acids and total lipids of the liver, plasma, adipose tissue and carcass of the male rat. *CR Seances Acad Sci D*, 290, 1479-1482.
- Gibson, D. M., Titchener, E. B., Wakil, S. J. (1958). Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. V. Bicarbonate requirement for the synthesis of long-chain fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 30, 376-383.
- Gnoni, G. V., Rochira, A., Leone, A., Damiano, F., Marsigliante, S., Siculella, L. (2011). 3,5,3'Triiodo-L-thyronine induces SREBP-1 expression by non-genomics actions in human HepG2 cells. *Journal of Cellular Physiology*, DOI 10.1002/jcp.22974.
- Goodridge, A. G. (1973). Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes. Evidence for a physiological role for long chain fatty acyl coenzyme A and citrate. *J Biol Chem*, 248, 4318-4326.
- Goulart-Silva, F., Serrano-Nascimento, C., Texeira, S. S., Nunes, M. T. (2013). Triiodothyronine (T3) induces proinsulin gene expression by activating PI3K: possible roles for GSK-3 β and the transcriptional factor PDX-1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 121, 14-9.
- Guo, W., Choi, J. K., Kirkland, J. L., Corkey, B. E., Hamilton, J. A. (2000). Esterification of free fatty acids in adipocytes: a comparison between octanoate and oleate. *Biochem J*, 349, 463-71.

- Han, J., Hamilton, J. A., Kirkland, J. L., Corkey, B. E., Guo, W. (2003). Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. *Obes Res*, 11, 734-44.
- Han, J. R., Deng, B., Sun, J. (2007). Effects of dietary medium-chain triglyceride on weight loss and insulin sensitivity in a group of moderately overweight free-living type 2 diabetic Chinese subjects. *Metabolism*, 56, 985-991.
- Hashim, S. A., Tantibhedyangkul, P. (1987). Medium chain triglyceride in early life: effects on growth of adipose tissue. *Lipids*, 22, 429-434.
- Hennigar, R. A., Pochet, M., Hunt, D. A., Lukacher, A. E., Venema, V. J., Seal, E., Marrero, M. B. (1998). Characterization of fatty acid synthase in cell lines derived from experimental mammary tumors. *Biochim. Biophys. Acta*, 1392, 85-100.
- Huveneers, S. et Danen, E. H. J. (2009). Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*, 122, 1059-1069.
- Iemitsu, M., Shimojo, N., Maeda, S., Irukayama-Tomobe, Y., Sakai, S., Ohkubo, T., Tanaka, Y., Miyauchi, T. (2008). The benefit of medium-chain triglyceride therapy on the cardiac function of SHRs is associated with a reversal of metabolic and signalling alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295, H136-H144.
- Inoue, A. N., Yamamoto, N. (1989). Unesterified long-chain fatty acids inhibit thyroid hormone binding to the nuclear receptor. Solubilized receptor and the receptor in cultured cells. *Eur J Biochem*, 183, 565-72.
- Jensen-Urstad, A. P. L., Semenkovich, C. F. (2012). Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821, 747-753.

- Jensen-Urstad, A. P., Song, H., Lodhi, I. J., Funai, K., Yin, L., Coleman, T., Semenkovich, C. F. (2013). Nutrient-dependent phosphorylation channels lipid synthesis to regulate PPAR α . *J Lipid Res*, 54, 1848-59.
- Jin, Q., Yuan, L. X., Boulbes, D., Baek, J. M., Wang, Y. N., Gomez-Cabello, D., Hawke, D. H., Yeung, S. C., Lee, M. H., Hortobagyi, G. N., Hung, M. C., Esteva, F. J. (2010). Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 12, R96.
- Joseph, S. B., Laffitte, B. A., Patel, P. H., Watson, M. A., Matsukuma, K. E., Walczak, R., Collins, J. L., Osborne, T. F., Tontonoz, P. (2002). Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem*, 277, 11019-11025.
- Jun, D. W., Cho, W. K., Jun, J. H., Kwon, H. J., Jang, K., Kim, H., Jeon, H. J., Lee, K. N., Lee, H. L., Lee, O. Y., Yoon, B. C., Choi, H. S., Hahm, J. S., Lee, M. H. (2011). Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by carnitine via reversal of mitochondrial dysfunction. *Liver International*, 31, 1315-1324.
- Kim, W. K. (2008). Effects of leptin on lipid metabolism and gene expression of differentiation-associated growth factors and transcription factors during differentiation and maturation of 3T3-L1 preadipocytes. *Endocr J*, 55, 827-837.
- Klemke, R. L., Cai, S., Giannini, A. L., Gallagher, P. J., De Lanerolle, P., Cheresch, D. A. (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol*, 137, 481-492.

- Kong, M., Mounier, C., Dumas, V., Posner, B. I. (2003). Epidermal Growth Factor-induced DNA Synthesis. Key role for Src phosphorylation of the docking protein Gab2. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 5837-5844.
- Kong, M., Mounier, C., Wu, J., Posner, B. I. (2000). Epidermal growth factor-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation and DNA synthesis. Identification of Grb2-associated binder 2 as the major mediator in rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 275(46):36035-42.
- Kusunoki, J., Kanatani, A., Moller, D. E. (2006). Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine*, 29, 91-100.
- Lee, J. W., Choi, H. S., Gyuris, J. (1995). Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Endocrinology*, 9, 243-254.
- Lei, J., Mariash, C. N., Ingbar, D. H. (2004). 3,3',5-Triiodo-L-thyronine up-regulation of Na,K-ATPase activity and cell surface expression in alveolar epithelial cells is Src kinase- and phosphoinositide 3-kinase-dependent. *J Biol Chem*, 279, 47589-600.
- Leveille, G. A., O'Hea, E. K., Chakrabarty, K. (1968). In vivo lipogenesis in the domestic chicken. *Proc Soc Exp Biol Med*, 128, 398-401.
- Lin, H. Y., Thacore, H. R., Davis, F. B., Davis, P. J. (1996). Thyroid hormone analogues potentiate the antiviral action of interferon-gamma by two mechanisms. *J Cell Physiol*, 167, 269-276.
- Listenberger, L., Brown, D. A. (2007). Fluorescent detection of lipid droplets and associated proteins. *Current Protocols in Cell Biology*, 24.2.1-24.2.11.

- Liu, K. (2002). Early expression of p107 is associated with 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol*, 194, 51-61.
- Liu, Y., Bishop, A., Witucki, L., Kraybill, B., Shimizu, E., Tsien, J., Ubersax, J., Blethrow, J., Morgan, D. O., Shokat, K. M. (1999). Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chem Biol*, 6, 671-8.
- Liu, Z., Falola, J., Zhu, X., Gu, Y., Kim, L. T., Sarosi, G. A., Anthony, T., Nwariaku, F. E. (2004). Antiproliferative effects of Src inhibition on medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 3503-9.
- Lizcano, J. M., Alessi, D. R. (2002). The insulin signaling pathway. *Curr Biol*, 12, R236-R238.
- Lodhi, I. J., Wei, X., Semenkovich, C. F. (2011). Lipoexpediency: de novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends Endocrinol Metab*, 22, 1-8.
- Lodhi, I. J., Yin, Li., Jersen-Urstad, A. P. L., Funai, K., Coleman, T., Baird, J. H., El Ramahi, M. K., Razani, B., Song, H., Fu-Hsu, F., Turk, J., Semenkovich, C. F. (2012). Inhibiting adipose tissue lipogenesis reprograms thermogenesis and PPAR γ activation to decrease diet-induced obesity. *Cell Metabolism*, 16, 189-201.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., Darnell, J. (2004). *Molecular Cell Biology* (5e édition). New York: WH Freeman.
- Loftus, T. M., Jaworsky, D. E. (2000). Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*, 288, 2379-81.
- Ma, L., Robinson, L. N. (2006). ChREBP*MLx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem*, 281, 28721-30.

- Macchia, P. E., Takeuchi, Y., Kawai, T., Cua, K., Gauthier, K., Chassande, O., Seo, H., Hayashi, Y., Samarut, J., Murata, Y. (2001). Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 349-354.
- Mader, S. S. (2009). *Biologie humaine* (2^e édition). Bruxelles: Éditions De Boeck Université.
- Maier, T., Jenni, S., Ban, N. (2006). Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science*, 311, 1258-1262.
- Mahabeleshwar, G. H., Feng, W., Phillips, D. R. et Byzova, T. V. (2006). Integrin signaling is critical for pathological angiogenesis. *J Exp Med*, 203, 2495-2507.
- Marten, B., Pfeuffer, M., Schrezenmeir, J. (2006). Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal*, 16, 1374-1382.
- Martin, S. G. (2001). The hunting of the Src. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 467-475.
- Melander, F., Andersson, T., Dib, K. (2003). Fgr but not Syk tyrosine kinase is a target for beta 2 integrin-induced c-Cbl-mediated ubiquitination in adherent human neutrophils. *Biochem J*, 370, 687-94.
- Mitra, S. K. et Schlaepfer, D. D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 516-523.
- Mitsubishi, T., Tennyson, G. E., and Nikodem, V. M. (1988). Alternative splicing generate messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 5804-5808.
- Moon, Y. S., Latasa, M. J. (2002). Suppression of fatty acid synthase promoter by polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*, 43, 691-8.

- Mounier, C. (1996). Clonage et caractérisation de la partie promotrice du gène aviaire de l'Acétyl CoA Carboxylase.
- Mounier, C., Posner, B. I. (2006). Transcriptional regulation by insuline: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol*, 84, 713-724.
- Mounier, C., Dumas, V., Posner, B. I. (2006). Regulation of hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin: central role for mammalian target of rapamycin independent of forkhead box O proteins. *Endocrinology*, 147, 2383-91.
- Mourouzis, I., Giagourta, I., Galanopoulos, G., Mantzouratou, P., Kostakou, E., Kokkinos, A. D., Tentolouris, N., Pantos, C. (2013). Thyroid hormone improves the mechanical performance of the post-infarcted diabetic myocardium: a response associated with up-regulation of Akt/mTOR and AMPK activation. *Metabolism*. 62, 1387-93.
- Nagao, K., Yanagita, T. (2008). Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Progress in lipid research*, 47, 127-146.
- Nagao, K., Yanagita, T. (2010). Medium-chain fatty-acids: Functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Pharmacological research*, 61, 208-212.
- O'Hea, E. K., Leveille, G. A. (1969). Lipid biosynthesis and transport in the domestic chick (*Gallus domesticus*). *Comp Biochem Physiol*, 30, 149-159.
- Papamandajaris, A. A., Mac Dougall, D. E., Jones, P. J. (1998). Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci*, 62, 1203-1215.

- Papamandjaris, A. A., White, M. D., Raeini-Sarjaz, M., Jones, P. J. (2000). Endogenous fat oxidation during medium chain versus long chain triglyceride feeding in healthy women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24, 1158–66.
- Patwardhan, P., Resh, M. D. (2010). Myristoylation and membrane binding regulate c-Src stability and kinase activity. *Mol Cell Biol*, 30, 4094-107. doi: 10.1128/MCB.00246-10.
- Phillips, D. R., Srinivasa, Prasad, K. S., Manganello, J., Bao, M., Nanizzi-Alaimo, L. (2001). Integrin tyrosine phosphorylation in platelet signalling. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 546-554.
- Pleiman, C. M., Clark, M. R., Gauen, L. K. T., Wintz, S., Coggeshall, K. M. (1993). Mapping of sites on the Src family protein tyrosine kinases p55blk, p59fyn, and p56lyn which interact with the effector molecules phospholipase C-2, microtubule-associated protein kinase, GTPase-activating protein, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*, 13, 5877-5887.
- Point, F., Akpa, M., Radenne, A. et Mounier, C. (2010). Inhibition of Insulin and T3-induced FAS expression by hexanoate. Biomed, Département des Sciences Biologiques, UQAM, Montréal, Québec, Canada.
- Poortmans, J. R., Boisseau, N. (2003). *Biochimie des activités physiques* (2^e édition). Bruxelles : Éditions De Boeck Université.
- Qureshi, A. A., Jenik, R. A., Kim, M., Lornitzo, F. A., Porter, J. W. (1975). Separation of two active forms (holo-a and holo-b) of pigeon liver fatty acid synthetase and their interconversion by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66, 344-351.

- Radenne, A., Akpa, M. M., Martel, C., Sawadogo, S., Mauvoisin, D., Mounier, C. (2008). Hepatic regulation of fatty acid synthase by insuline and T3: evidence for T3 genomic and non-genomic actions. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295, E884-E894.
- Razani, B., Zhang, H., Schulze, P. C., Schilling, J. D., Verbsky, J., Lodhi, I. J., Topkara, V. K., Feng, C., Coleman, T., Kovacs, A., Kelly, D. P., Saffitz, J. E., Dorn, G. W., Nichols, C. G., Semenkovich, C. F. (2011). Fatty acid synthase modulates homeostatic responses to myocardial stress. *J Biol Chem*, 286, 30949-30961.
- Ribaux, P. G. et Iynedjian, P. B. (2003). Analysis of the role of protein kinase B (cAKT) in insulin-dependent induction of glucokinase and sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) mRNAs in hepatocytes. *Biochem. J*, 376, 697-705.
- Roncero, C., Goodridge, A. G. (1992). Hexanoate and octanoate inhibit transcription of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture. *Journal of biology and chemistry*, 267, 14918-14927.
- Saltiel, A. R. et Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799-806.
- Samelson, L. E., Egerton, M., Thomas, P. M., Wange, R. L. (1992). The T cell antigen receptor tyrosine kinase pathway. *Adv. Exp. Med. Biol*, 323, 9-16.
- Sanjay, A., Houghton, A., Neff, L., DiDomenico, E., Bardelay, C., Antoine, E., Levy, J., Gailit, J., Bowtell, D., Horne, W. C., Baron, R. (2001). Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *J Cell Biol*, 152, 181-95.

- Scalfi, L., Coltorti, A., Contaldo, F. (1991). Postprandial thermogenesis in lean and obese subjects after meals supplemented with medium-chain and long-chain triglycerides. *Am J Clin Nutr*, 53, 1130-1133.
- Schlaepfer, D. D., Broome, M. A., Hunter, T. (1997). Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and the Nck adaptor proteins. *Mol Cell Biol*, 17, 1702-1713.
- Schliess, F., Reissmann, R., Reinehr, R., Vom Dahl, S., Haussinger, D. (2004). Involvement of integrins and Src in insulin signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *Journal of biological chemistry*, 279, 21294-21301.
- Schröder, M., Müller, K. M., Kahlen, J. P. et Carlberg, C. (1994). Vitamin D3-thyroid hormone receptor heterodimer polarity directs ligand sensitivity of transactivation. *Nature* 370, 382-386.
- Semenkovich, C. F. (1997). Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Prog Lipid Res*, 36(1), 43-53.
- Shimokawa, T., Kumar, V. M. (2002). Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 66-71.
- Song, Y., Yao, X., Ying, H. (2011) Thyroid hormone action in metabolic regulation. *Protein Cell*, 2, 358-368.
- Stapleton, S. R., Mitchell, D. A., Salati, L. M., Goodridge, A. G. (1990). Triiodothyronine stimulates transcription of the fatty acid synthase gene in chick embryo hepatocytes in culture. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 18442-18446.

Stoops, J. K., Arslanian, M. J., Oh, Y. H., Aune, K. C., Vanaman, T. C., Wakil, S. J. (1975).

Presence of two polypeptide chains comprising fatty acid synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72, 1940-1944.

St-Onge, M. P., Ross, R., Parsons, W. D., Jones, P. J. H. (2003). Medium-chain triglycerides increase energy expenditure and decrease adiposity in overweight men. *Obes Res*, 11, 395-402.

St-Onge, M. P., Bourque, C., Jones, P. J., Ross, R., Parsons, W. E. (2003). Medium-versus long-chain triglycerides for 27 days increases fat oxidation and energy expenditure without resulting in changes in body composition in overweight women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27, 95-102.

Sugimoto, Y. (2007). A novel acetyl-CoA carboxylase inhibitor reduces de novo fatty acid synthesis in HepG2 cells and rat primary hepatocytes. *Arch Biochem Biophys*, 468, 44-48.

Summy, J. M., Trevino, J. G., Lesslie, D. P., Baker, C. H., Shakespeare, W. C., Wang, Y., Sundaramoorthi, R., Keats, J. A., Sawyer, T. K., Gallick, G. E. (2005). AP23846, a novel and highly potent Src family kinase inhibitor, reduces vascular endothelial growth factor and interleukin-8 expression in human solid tumor cell lines and abrogates downstream angiogenic processes. *Mol Cancer Ther*, 4, 1900-11.

Thomas, S. M. et Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, 513-609.

Thurmond, D. C., Baillie, R. A., Goodridge, A. G. (1998). Regulation of the action of steroid/thyroid hormone receptors by medium-chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 15373-15381.

- Tsygankov, A., Mahajan, S., Fincke, J. E., Bolen, J. B. (1996). Specific association of tyrosinephosphorylated c-Cbl with Fyn tyrosine kinase in T cells. *J. Biol. Chem*, 271(43), 27130–37.
- Uyeda, K., Yamashita, H. (2002). Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem Pharmacol*, 63, 2075-80.
- Wakil, S. J. (1989). Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry*, 28, 4523-4530.
- Wakil, S. J., Stoops, J. K., Joshi, V. C. (1983). Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem*, 52, 537-579.
- Wegener, K. L., Campbell, I. D. (2008). Transmembrane and cytoplasmic domains in integrin activation and protein-protein interactions (review). *Mol Membr Biol*, 25, 376-387.
- Wei, X., Schneider, J. G., Shenouda, S. M., Lee, A., Towler, D. A., Chakravarthy, M. V., Vita, J. A., Semenkovich, C. F. (2011). De novo lipogenesis maintains vascular homeostasis through endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) palmitoylation. *J Biol Chem*, 286, 2933-2945.
- Wei, X., Yang, Z., Rey, F. E., Ridaura, V. K., Davidson, N. O., Gordon, J. I., Semenkovich, C. F. (2012). Fatty acid synthase modulates intestinal barrier function through palmitoylation of mucin 2. *Cell Host Microbe*, 11, 140-152.
- Xue, C., Liu, Y., Wang, J., Zhang, R., Zhang, Y., Zhang, J. (2009). Consumption of medium and long-chain triacylglycerols decreases body fat and blood triglyceride in Chinese hypertriglyceridemic subjects. *Eur J Clin Nutr*, 63, 879–86.

- Yamanashi, Y., Fukui, Y., Wongsasant, B., Kinoshita, Y., Ichimori, Y. (1992). Activation of Src-like protein-tyrosine kinase Lyn and its association with phosphatidylinositol 3-kinase upon B-cell antigen receptormediated signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 1118-1122.
- Yen, P. M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Reviews*, 81(3), 1097-1142.
- Yin, L., Zhang, Y., Charron, T., Hillgartner, F. B. (2000). Thyroid hormone, glucagon, and medium-chain fatty acids regulate transcription initiated from promoter 1 and promoter 2 of the acetyl-CoA carboxylase-alpha gene in chick embryo hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, 15(1517), 91-99.
- Yu, H., Wu, J., Yang, M., Guo, J., Zheng, L., Peng, M., Zhang, Q., Xiang, Y., Cao, J., Shen, W. (2012). Involvement of Liver X Receptor alpha in histone modifications across the target fatty acid synthase gene. *Lipids*, 47, 249-257.
- Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S. M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., Xiong, Y., Guan, K.L. (2010) Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*, 327, 1000-1004.